

Aus der Abteilung für Unfallchirurgie

Direktor: Prof. Dr. M. Nerlich

Medizinische Fakultät

**In-Vitro Studien zur lipolytischen Wirkung von
Phosphatidylcholin im 3T3-L1 Adipozytenmodell**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Universität
Regensburg**

Vorgelegt von Silvan M. Klein

2010

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. B. Weber |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. M. Nerlich |
| 2. Berichterstatter: | PD Dr. M. Jung |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 27.09.2010 |

Gliederung

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| <u>1. Einleitung</u> | 4 |
| <u>2. Hintergrund</u> | 4 |
| 2.1. Fettverteilungsstörungen | 4 |
| 2.2. Liposuktion | 5 |
| 2.3. Injektionslipolyse | 6 |
| 2.4. Fragestellung | 7 |
| 2.5. Lipolyse | 7 |
| 2.5.1. Biochemische Lipolyse | 7 |
| 2.5.2. Lyse von Lipiddoppelmembranen | 10 |
| 2.3 Phosphatidylcholin | 10 |
| 2.4 Desoxycholat | 11 |
| <u>3. Methodik</u> | 11 |
| 3.1 Zellkultur | 12 |
| 3.2 Lipolyse-Assay | 14 |
| 3.3 MTT-Assay | 15 |
| 3.4 Propidiumjodidfärbung | 15 |
| <u>4. Ergebnisse</u> | 17 |
| 4.1 Kontrollen | 17 |
| 4.2 Lipolyse-Assay | 17 |
| 4.3 MTT-Assay | 17 |
| 4.4 Propidiumjodidfärbung | 17 |
| 4.5 Lichtmikroskopie | 18 |
| <u>5. Diskussion</u> | 22 |
| <u>6. Zusammenfassung</u> | 23 |
| <u>7. Originalarbeit</u> | 24 |
| <u>8. Verzeichnisse</u> | 33 |
| 8.1 Literaturverzeichnis | 33 |
| 8.2 Abbildungsverzeichnis | 34 |
| <u>9. Anhang</u> | 34 |
| 9.1 Danksagung | 34 |
| 9.2 Lebenslauf | 35 |
| 9.3 Erklärung | 36 |

Erläuterungen zur Originalarbeit: In Vitro Studies Investigating the Effect of Subcutaneous Phosphatidylcholine Injections in the 3T3-L1 Adipocyte Model: Lipolysis or Lipid Dissolution?

1. Einleitung

Die Ergebnisse dieser Versuchansätze wurden im August 2009 in einer Publikation unter dem Titel „In Vitro Studies Investigating the Effect of Subcutaneous Phosphatidylcholine Injections in the 3T3-L1 Adipocyte Model: Lipolysis or Lipid Dissolution?“ in dem Journal of Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg sieht nach Paragraph 4, Absatz 4 die Vorlage einer Originalarbeit als Dissertationsarbeit vor, sofern der Doktorand als Erstautor auf dieser Originalarbeit aufgeführt wird. Die Promotionskommission verlangt zudem, dass dieser Originalarbeit eine zusätzliche Erläuterung zu den Einzelheiten der Publikation beigelegt wird; daher sollen die folgenden Ausführungen zu diesen Experimenten die Publikation weder übersetzen noch ersetzen. Vielmehr sollen Details zu dem Thema Lipolysetherapie, sowie zu den in dieser Arbeit angewandten Methodiken erläutert werden, die in der ursprünglichen Originalarbeit aufgrund der strikten Journalvorgaben keine Berücksichtigung fanden.

2. Hintergrund

2.1 Fettverteilungsstörungen

Die pathogenetischen Ursachen für einen regionalen Überschuss an Unterhautfettgewebe sind im Einzelnen sehr unterschiedlich und bei weitem nicht immer - wie häufig fälschlicherweise angenommen - durch eine übermäßige Energiezufuhr bedingt. Neben häufigen hormonellen Dysfunktionen, wie beispielsweise dem durch Hypercortisolismus bedingtem Morbus Cushing, ist eine relativ seltene aber gravierende Ursache der Morbus Madelung. Während die

Lipomatose bei dem Hypercortisolismus in der Regel mit einer Einstellung der Serumcortisolkonzentration auf physiologische Spiegel rückläufig ist, stehen bei Erkrankungen wie dem Morbus Cushing – dessen Genese noch weitgehend unverstanden ist - nicht selten nur rein symptomatische Therapieoptionen zur Verfügung.^{2,3,4}

2.2 Liposuktion

Zunächst ist hier die Liposuktion zu nennen, bei der im Wesentlichen das überschüssige Fettvolumen über eine Kanüle unter Sog entfernt wird. Bei der heute am häufigsten angewandten Liposuction werden zunächst mittels einer großlumigen Kanüle einige Liter einer Tumescenzlösung bestehend aus Lidocain und Vasokonstringentien eingebracht, welche die Adipozyten aus ihrem Gewebeverbund löst und zudem der folgenden Ödembildung als auch dem Blutverlust entgegenwirkt. Es folgt die mechanische Mobilisierung der Adipozyten aus ihrem Verbund mit der Liposuktionskanüle unter kontinuierlichem Aspiratorsog. Die gelösten Adipozyten werden nach ihrem Weg über die Kanüle in einen Auffangcontainer vor dem Aspirator gesammelt.⁵ Unbestrittene Vorteile dieser Methode sind sowohl die langjährige klinische Erprobung als auch eine effektive Volumenreduktion des Unterhautfettgewebes in kürzester Zeit. Doch muss trotz der Effektivität auch auf die Gefahren dieses Eingriffs hingewiesen werden. Neben allgemeinen Risiken operativer Eingriffe wie Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen und den potentiellen Gefahren der hierfür in der Regel notwendigen Allgemeinanästhesie, entstehen Risiken durch das beträchtliche Ausmaß an entstandener Wundfläche. Neben Blutverlusten, insbesondere nach dem Abklingen der Wirkung der intraoperativ eingebrachten Vasokonstriktoren, besteht die Gefahr eines allgemeinen Flüssigkeitsverlustes bis zum Vollbild des hypovolämischen Schockzustandes. Nicht zu unterschätzen ist zudem die Gefahr der akzidentiellen Penetration von Organen, wie beispielsweise des Gastrointestinaltraktes oder des Thorax, durch das mechanische Lösen der Adipozyten mit der Liposuktionskanüle. Beschreibungen zu Fällen von unbemerkten Darmpenetrationen finden sich wiederholt in der Literatur. Die Anwendung dieser Methode sollte daher ausschließlich durch Fachärzte für Plastische- und Ästhetische Chirurgie erfolgen.⁶

Neben der teilweise nicht unerheblichen funktionellen Einschränkungen durch die Lipomatose - vor allem in der Cervikalregion - sollte der enorme Leidensdruck der

betroffenen Patienten nicht außer Acht gelassen werden.⁷ Sowohl diätetische Maßnahmen als auch ein erhöhtes Maß an Sport, führen nicht zu einer Reduktion der Lipomatose. Spontanremissionen sind beispielsweise für den Morbus Madelung bisher nicht beschrieben.

2.3 Injektionslipolyse

Aufgrund den beschriebenen Nachteile der Liposuktion wurden in den letzten Jahren verstärkt Anstrengungen unternommen, die Liposuktion, insbesondere bei geringeren Volumenüberschüssen, durch risikoärmere Therapiemethoden zu ersetzen. Hier erfolgte der Einsatz nach einer Publikation von Rittes et al. besonders der Einsatz von Phosphatidylcholin.⁸ Die Autoren haben erstmals die klinische Beobachtung einer Volumenreduktion nach subkutaner Applikation von Phosphatidylcholin beschrieben.

In Europa kommt für diese „Lipolysetherapie“ in der Regel das in Desoxylcholot gelöste Phosphatidylcholin zum Einsatz, welches in Deutschland unter dem Handelsnamen Lipostabil® vertrieben wird. Lipostabil® fand seine Markteinführung in den 1970er Jahren als intravenös applizierbares Arzneimittel zur Therapie und Prävention von Fettembolien; somit handelt es sich bei der Therapie von Fettverteilungsstörungen mit dem Medikament Lipostabil® um einen sog. doppelten „Off-Label-Use“, da dieses Arzneimittel behördlicherseits weder zur subkutanen Applikation noch zur Volumenreduktion von subkutanem Fettgewebe zugelassen ist. Daher überrascht es kaum, dass die Studienlage zu dieser Anwendung äußerst mäßig ist. Neben weiteren Veröffentlichungen klinischer Studien, die den vorbeschriebenen volumenreduzierenden Effekt stützen, existiert eine weitere experimentelle Studie, bei der jedoch kein in-vitro Adipozytenmodell zur Anwendung kam.^{8,9} Daher besteht nur eine fragliche Übertragbarkeit der gewonnenen Daten auf die in-vivo Situation.

Vor diesem Hintergrund wird die Frage, welche Substanz in Lipostabil® lipolytisch wirksam ist und wodurch der lipolytische Effekt tatsächlich zustande kommt nach wie vor kontrovers diskutiert. Dabei gilt es genau zwischen den Begrifflichkeiten lipolytisch, im Sinne eines biochemischen Enzymkatabolismus und lipolytisch im Sinne einer Zellyse von Adipozyten zu differenzieren. Obwohl ein volumenreduzierender Effekt letztlich sowohl bei Ersterem als auch bei Letzterem zu erwarten wäre, ist eine Unterscheidung in Bezug auf potenzielle Risiken und Grenzen der Therapie unabdingbar.

2.4 Fragestellung

Diese Studie zielt darauf ab, die einzelnen Substanzen in Lipostabil auf ihren lipolytischen Charakter hin zu überprüfen. Im einzelnen sollen die in Lipostabil® enthaltenen Einzelsubstanzen isoliert und in Kombination auf ihre lipolytische und cytotoxische Aktivität hin geprüft werden; zudem werden durch die Prüfung der Einzelkomponenten in unterschiedlicher Kombination eventuelle synergistische Effekte der Einzelsubstanzen berücksichtigt. Schließlich soll diese Studie Aufschluss über den tatsächlichen Wirkmechanismus des beschriebenen volumenreduzierenden Effektes von Phosphatidylcholin bringen.

2.5 Lipolyse

2.5.1 Biochemische Lipolyse

Bei der biochemischen Lipolyse handelt sich um einen sowohl durch α_2 - als auch durch β_1 -rezeptoren induzierten Enzymkatabolismus. Die Erkennung des Rezeptorliganden am Transmembranrezeptor führt zur Phosphorylierung von Guanin-Di-Phosphat (GDP), welches damit zu Guanin-Tri-Phosphat (GTP) wird. Guanin-Tri-Phosphat selbst wiederum induziert an einem cytoplasmaseitigen membranständigen Rezeptor die Umsetzung von Adenosin-Tri-phosphat (ATP) zu cyclischem Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) welches dann über die Aktivierung einer Proteinkinase die Triglycerinlipase aktiviert (Abb. 1a). Die aktivierte Triglycerinlipase spaltet hydrolytisch die aus Glycerol und jeweils drei Fettsäureresten bestehenden Triglyceride, die anschließend durch Veresterung mit Cholesterin über Serumlipoproteine dem Lebermetabolismus zugeführt werden (Abb. 1b).¹⁰

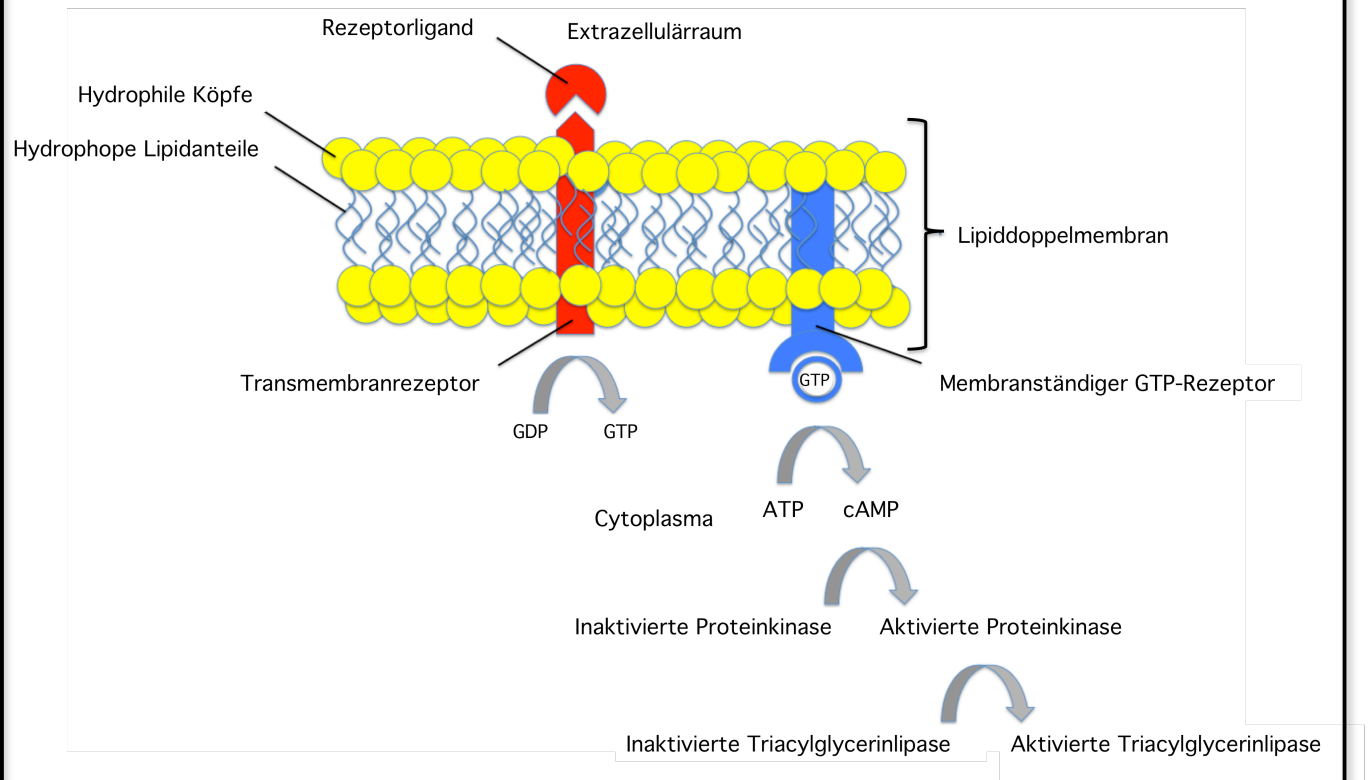


Abb. 1a: Signaltransduktion der biochemischen Lipolysekaskade

Cytoplasma



Tri-acylglycerid



Hormonsensitive Tri-acylglycerid-Lipase



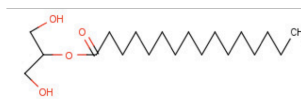
Di-acylglycerid

+

1 Fettsäure



Hormonsensitive Di-acylglycerid-Lipase



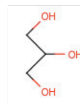
Mono-acylglycerid

+

2 Fettsäuren



Mono-acylglycerid-Lipase



Glycerol

+

3 Fettsäuren



Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase

Cholesterin-Fettsäure-Ester

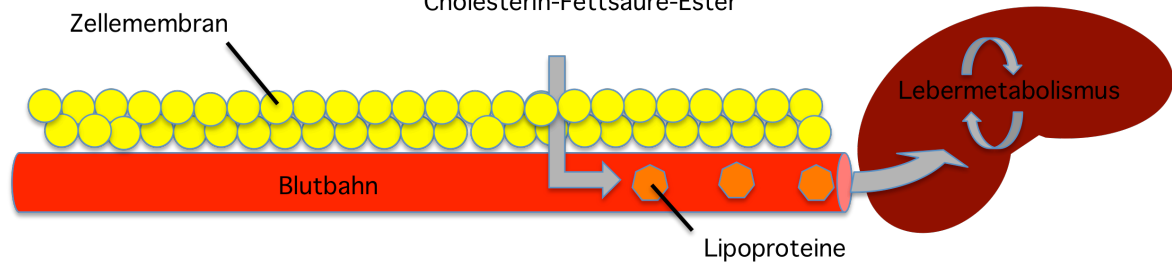
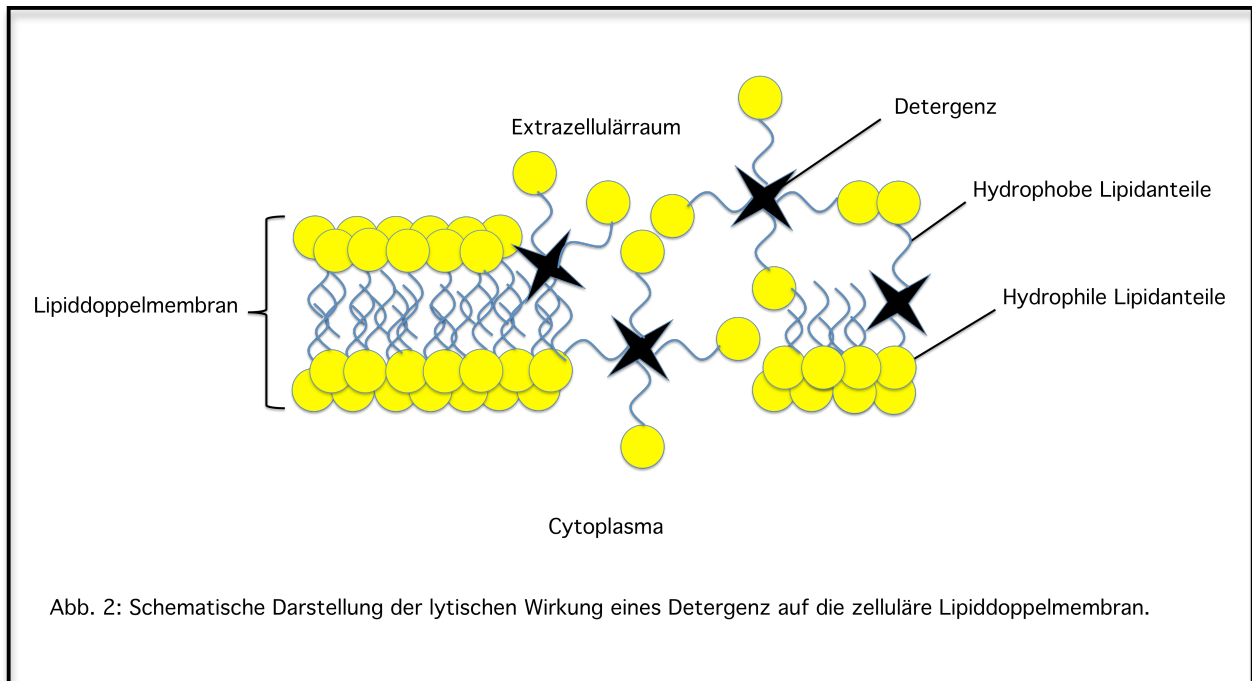


Abb. 1b: Schematische Darstellung des Triacylglyceridstoffwechsels.

2.5.2 Lyse von Lipiddoppelmembranen

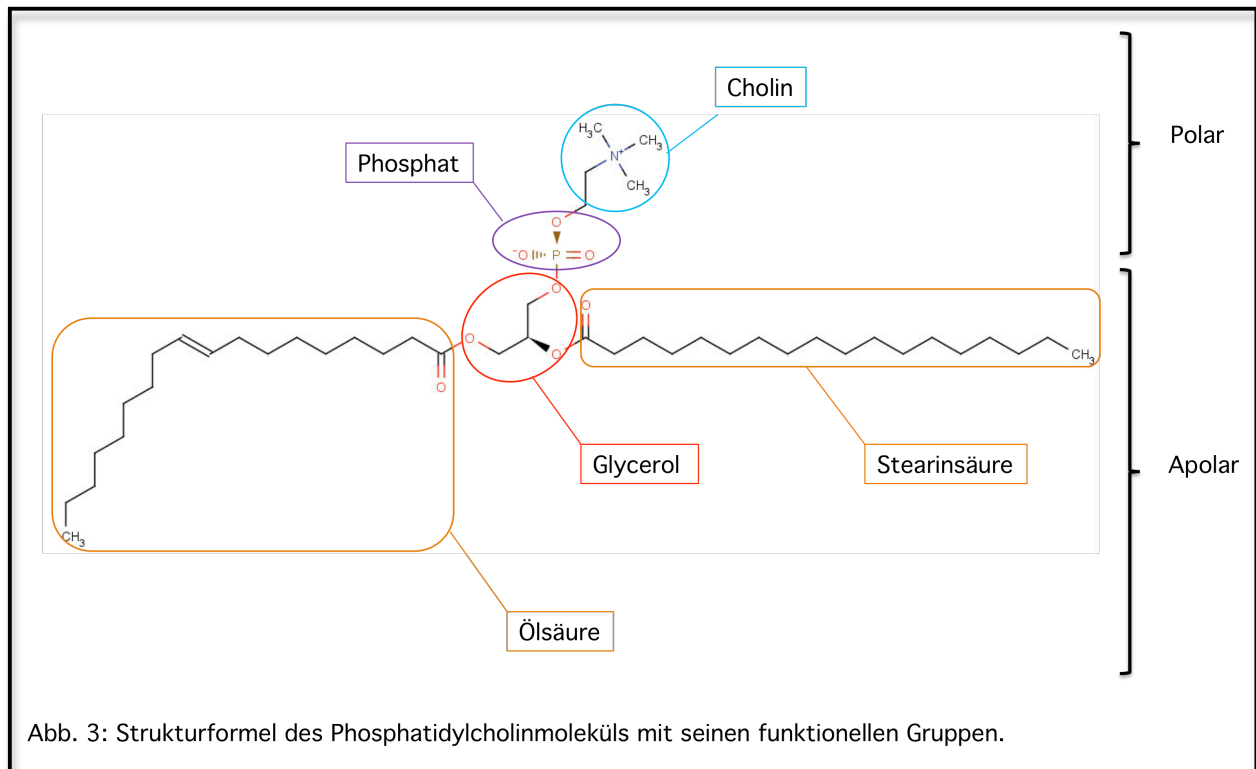
Die lytische Durchbrechung der Membranintegrität, ist ein nicht-enzymvermittelter Prozess bei dem Substanzen mit Detergenzwirkung die Zellmembran durch Mizellenbildung mit Membranlipiden zerstören und somit den nekrotischen Untergang der Zelle einleiten (Abb. 2).



2.3 Phosphatidylcholin

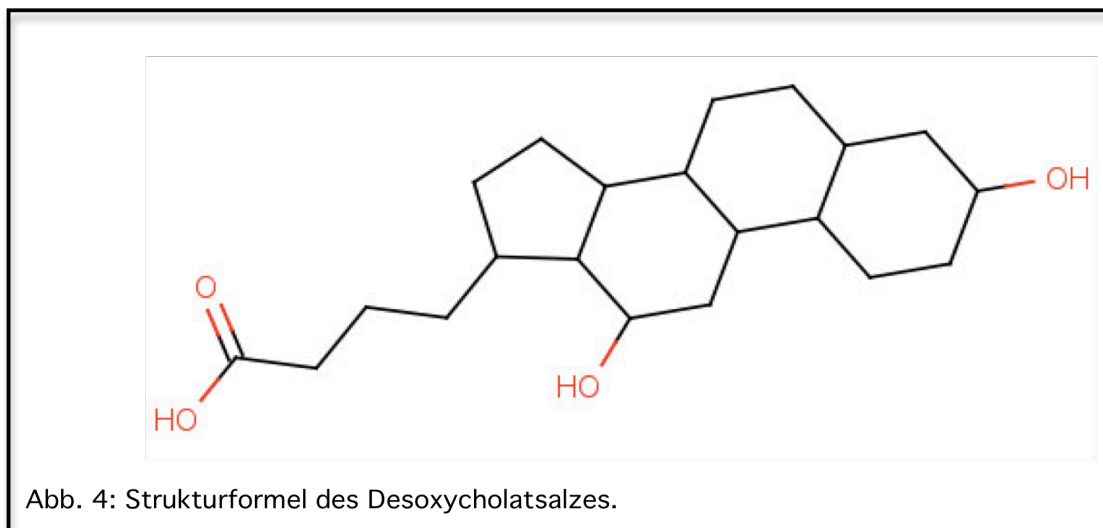
Bei Phosphatidylcholin, auch als Lecithin bezeichnet, handelt es sich um ein Lipid aus der Gruppe der Phosphoglyceride. Phosphoglyceride bestehen aus zwei an Glycerin gebunden Fettsäuren sowie über einen Phosphodiester gebundene weitere funktionelle Gruppe. An Phosphatidylcholin ist ein negativ geladener Cholinrest gebunden, welcher gemeinsam mit dem Phosphation für den Zwitterionischen Charakter von Phosphatidylcholin verantwortlich ist (Abb. 3).¹¹

Phosphatidylcholin ist durch seinen bipolaren Charakter Bestandteil zahlreicher Biomembranen sowie auch des in den Lungenalveolen vorkommenden Surfactant.



2.4 Desoxycholat

Chemisch handelt es sich bei Desoxycholat um eine an Sterol gebundene Fettsäure. Desoxycholat ist Bestandteil der Gallensäuren und ermöglicht durch seine Emulgatorwirkung die Fettverdauung (Abb. 4).¹¹ Es entsteht durch bakterielle Umwandlung aus Cholat.



3. Methodik

3.1 Zellkultur

Die in-vitro Experimente wurden an einem 3T3-L1 Adipozytenmodell durchgeführt. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Präadipozytenlinie, welche einem Subklon der 3T3 Fibroblastenzelllinie einer Mausspezies entstammt. Präadipozyten zeichnen sich im Gegensatz zu reifen Adipozyten durch ihre noch vorhandene Teilungsfähigkeit aus und entsprechen sowohl morphologisch als funktionell der Zelllinie der Fibroblasten. Dieser Zelltyp lässt sich durch die vorhandene Teilungsfähigkeit in Zellkulturen heranzüchten und anschließend mittels eines Differenzierungsmediums - welches wesentliche Schlüsselenzyme des Lipidenzymmetabolismus induziert - zu reifen Adipozyten differenzieren. Alle beschriebenen Experimente wurden jeweils 10 Tage nach Zugabe des Differenzierungsmediums ausgeführt. Zudem erfolgte nach jeweils 24h eine lichtmikroskopische Prüfung der Differenzierung der Adipozyten. Bei einer semiquantitativ evaluierten adipogenen Differenzierung von unter 80 Prozent der Zellen wurden die Zellkulturen für die Versuche als untauglich befunden und nicht für die Studie verwendet. Die adipozytäre Differenzierung zeigt sich morphologisch durch den Wechsel von der schlanken Fibroblastenform zu einem größeren sphärischen Erscheinungstyp der Zellen, sowie durch die Einlagerung von gelblichen Lipidvakuolen (Abb. 5).

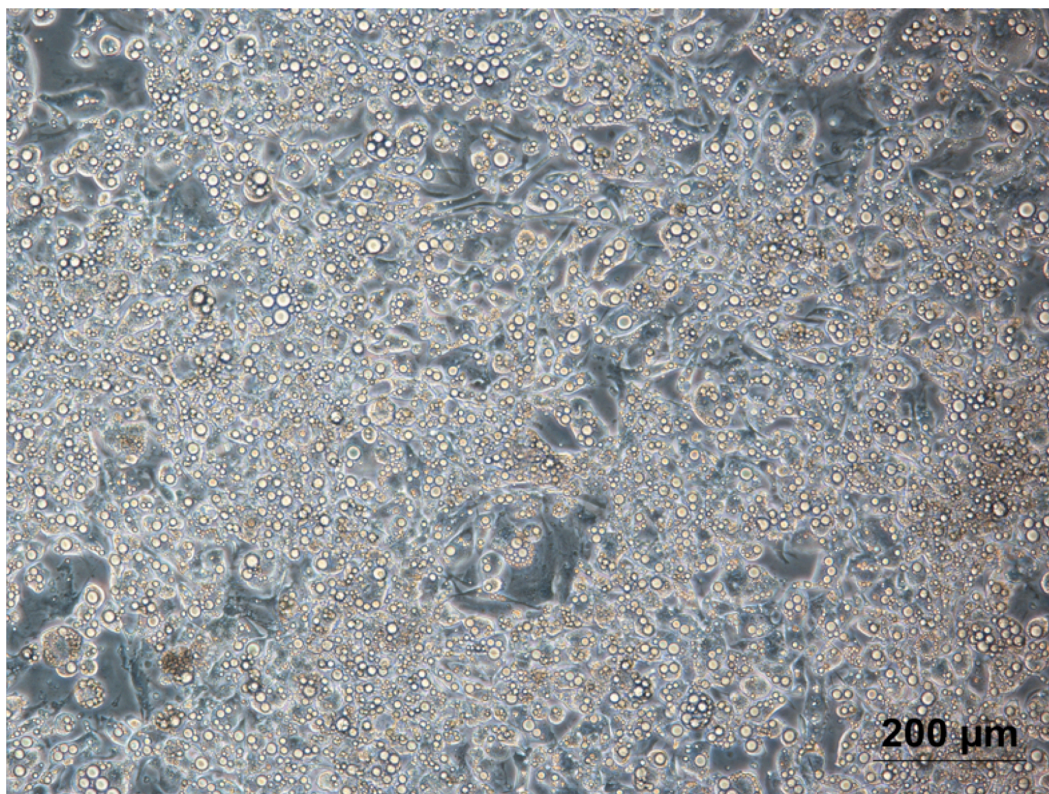
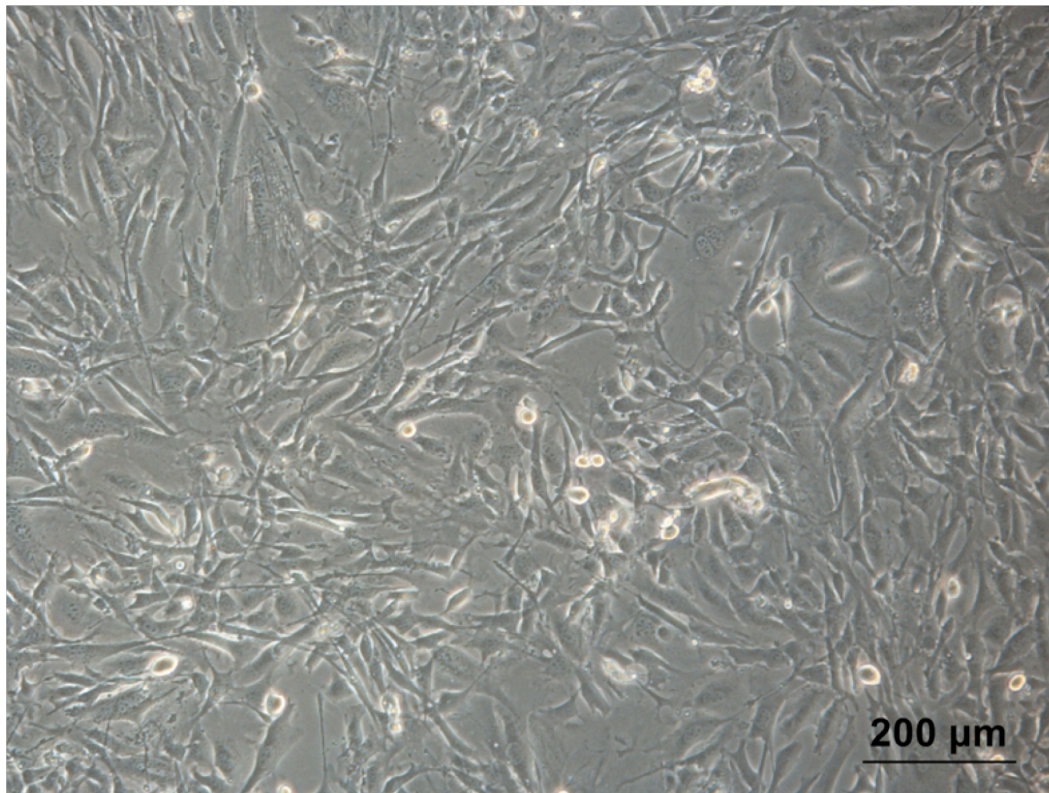
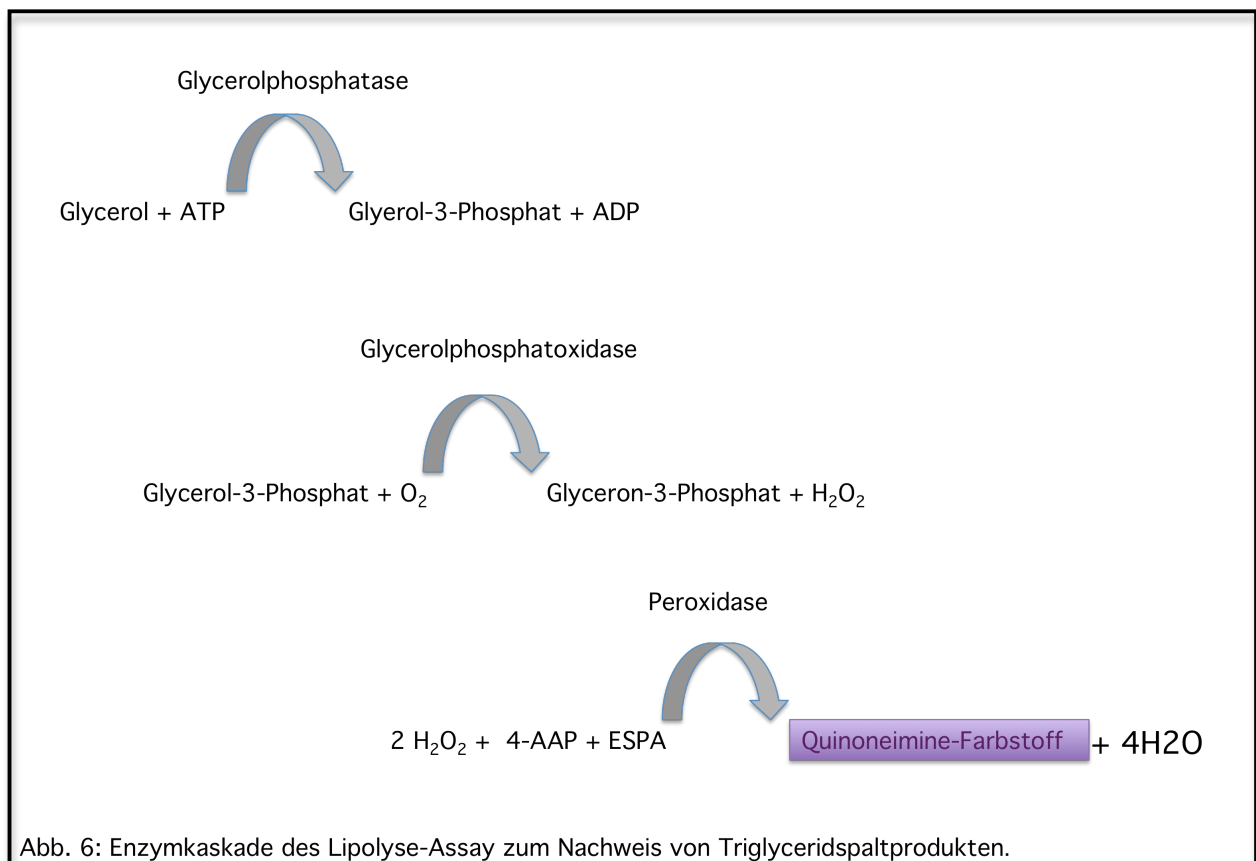


Abb. 5: Oben: Undifferenzierte 3T3-L1 Präadipozyten, die in Morphologie und Funktion der Zelllinie der Fibroblasten entsprechen. Unten: Voll ausdifferenzierte Adipozyten mit sphäroider Form und gelblichen Fettvakuolen, dazwischen einige Nester undifferenzierter Zellen. (Lichtmikroskopische Aufnahme, 40x, nativ)

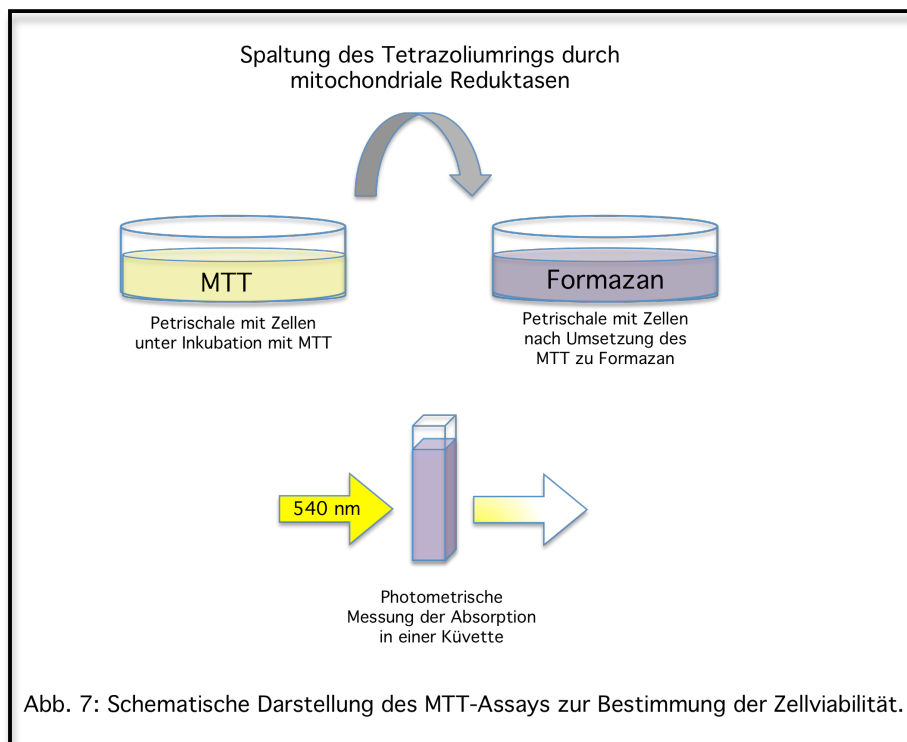
3.2 Lipolyse-Assay

Während der enzymatischen Lipolyse werden durch die aktivierte Triacylglycerinlipase hydrolytisch die Fettsäuren an ihren Esterbindungen mit Glycerol abgespalten (Abb. 1b). Der in diesem Experiment angewandte Lipolyse-Assay weist über mehrere Zwischenreaktionen das hierbei entstandene Glycerol nach. Zunächst wird Glycerol unter der Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) und der Glycerolkinase zu Glycerolphosphat phosphoryliert. In einer Oxidation werden zwei Wasserstoffatome abgespalten und reduzieren somit den Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid, während Glycerondiphosphat wiederum zu Glyceronphosphat oxidiert wird. In einem letzten Schritt wird das entstandene Wasserstoffperoxid durch die Peroxidase unter Anwesenheit von 4-Aminoantipyrin (4-AAP) und N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl)-m-Anisidin (ESPA) in einer weiteren Redoxreaktion zu Wasser reduziert, wobei der violette Quinoneiminefarbstoff entsteht, welcher sich bei einer Wellenlänge von 540 nm spektrophotometrisch nachgewiesen lässt (Abb. 6). Die direkt proportionale Zunahme der Extinktion durch die glycerolinduzierte Quinoneiminefarbstoffbildung erlaubt die Evaluation der lipolytischen Aktivität pro Zellzahl einzelner Wells.



3.3 MTT-Assay

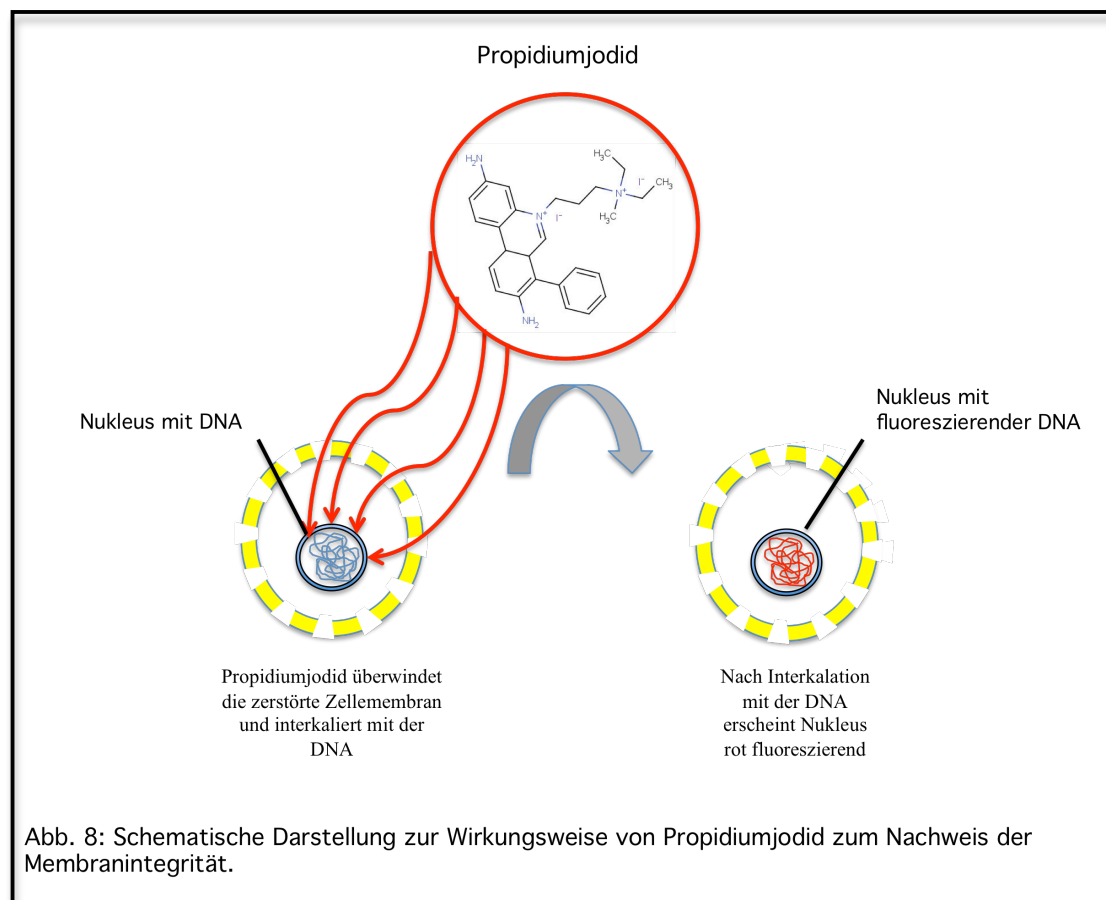
Hinter dem Akronym MTT verbirgt sich die chemische Bezeichnung 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromid. Hierbei handelt es sich um einen gelblichen Farbstoff, der durch Spaltung des Tetrazoliumrings zu violetter Formazan umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch die Redoxenzyme der mitochondrialen Atmungskette katalysiert und setzt somit den intakten Stoffwechsel der Zelle voraus. Der Farbumschlag beweist daher den aktiven Metabolismus lebender Zellen und erlaubt die Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen.¹² Die Absorption violetten Formazans kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm quantifiziert werden (Abb. 7).



3.4 Propidiumjodidfärbung

Bei Propidiumjodid handelt es sich um ein Molekül, welches zwischen den Elektronen zweier Basenpaare der Zell-DNA zu interkalieren vermag. Durch die Interkalation erhöht sich die Fluoreszenz von gebundenem Propidiumjodid um das etwa 35-fache gegenüber dem freiem Propidiumjodid. Diese Zunahme der Fluoreszenz erlaubt die Unterscheidung zwischen freiem und gebundenem Farbstoff.

Ladungsbedingt vermag Propidiumjodid jedoch nicht die intakte Lipiddoppelmembran von Zellen zu überwinden. Somit lassen sich ausschließlich jene Zellen anfärben, deren Lipiddoppelmembranen bereits zerstört sind; hierdurch erklärt sich auch die Bezeichnung Todfarbstoff für Propidiumjodid, da die selektive Anfärbung der Nukleoli untergegangener Zellen eine Unterscheidung zwischen bereits toten und noch aktiven Zellen erlaubt (Abb. 8).¹³ Das Emissionsmaximum und damit die Rotfärbung der Nukleoli nekrotischer Zellen wird bei einer Wellenlänge von 590-620 nm unter dem konfokalen Mikroskop beurteilt.



4. Ergebnisse

4.1 Kontrollen

Die isolierte Testung von Phosphatidylcholin getrennt von seinem ursprünglichen Lösungsmittel Desoxycholol erforderte die Anwendung eines Ersatzlösungsmittels, da pures Phosphatidylcholin als Lipid in wässrigem Milieu unlöslich ist. Es zeigte sich, dass Phosphatidylcholin in 70%igem Ethanol in eine lösliche übergeht. Bei den Negativ-Kontrollen aller Versuchsreihen erfolgte stets die Zugabe von 70%igem Ethanol äquivalent der zur Lösung des Phosphatidylcholins verwendeten Konzentration. Somit kann eine potenzielle Verfälschung der Ergebnisse durch Alkohol als Lösungsmittel ausgeschlossen werden.

4.2 Lipolyse-Assay

Die Testung einer möglichen Induktion einer lipolytischen Enzymkaskade konnte neben der Positivkontrolle ausschließlich für die Gruppe mit der Konzentration 1,0 mg/ml Phosphatidylcholin nachgewiesen werden. Kein Anstieg der Lipolyseparameter ließ sich unter den getesteten Konzentrationen von Lipostabil® – also in Desoxycholol gelöstes Phosphatidylcholin – nachweisen (Abb. 9).

4.3 MTT-Assay

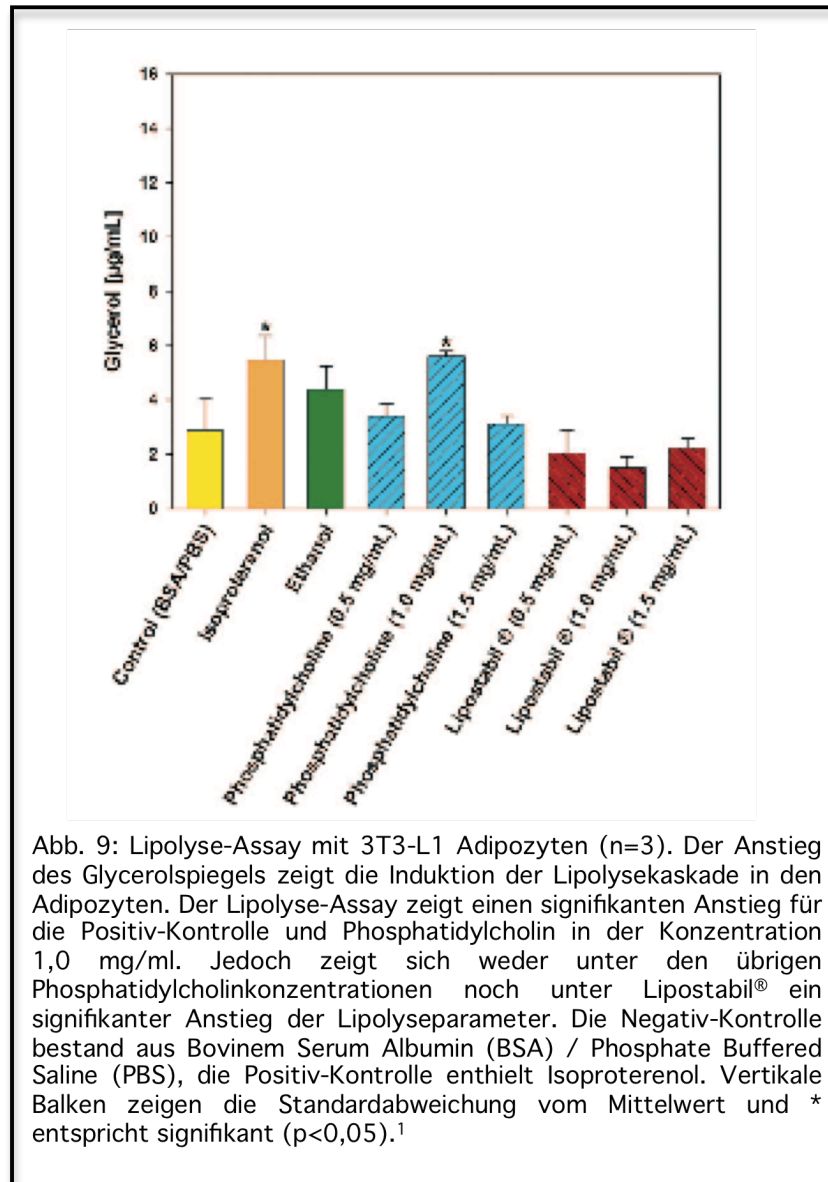
Die Erfassung der Zellviabilität nach Behandlung der Zellen mit den Einzelsubstanzen ergab für Desoxycholol ab einer Konzentration 0,15 mg/ml sowie für Lipostabil® ab einer Konzentration von 0,1 mg/ml einen signifikanten bzw. hochsignifikanten Zelluntergang (Abb. 10).

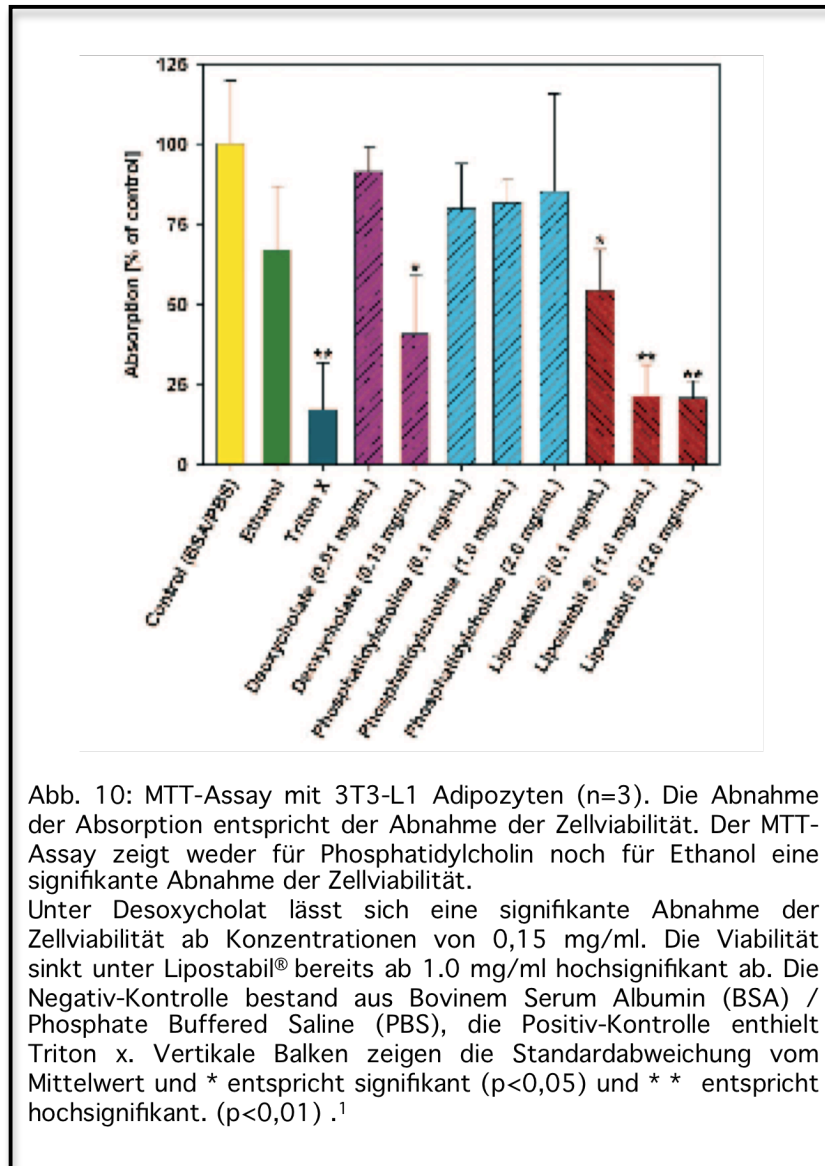
4.4 Propidiumjodidfärbung

In der Prüfung der Membranintegrität mit Propidiumjodid zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz der Nukleoli nach Desoxychololexposition ab einer Konzentration von 0,05 mg/ml, die mit Erhöhung der Konzentration stetig zunahm. Keinerlei Fluoreszenz der Adipozytennukleoli konnte jedoch durch die alleinige Exposition gegenüber Phosphatidylcholin erzielt werden (Abb. 11 u. 12).

4.5 Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopische Evaluation zeigte keinerlei offensichtliche Veränderungen nach Phosphatidylcholinoxposition, während die Zugabe von Desoxycholat bereits ab einer Konzentration 0.10 mg/ml eine deutliche Unschärfe der Zellgrenzen verursachte (Abb. 13).





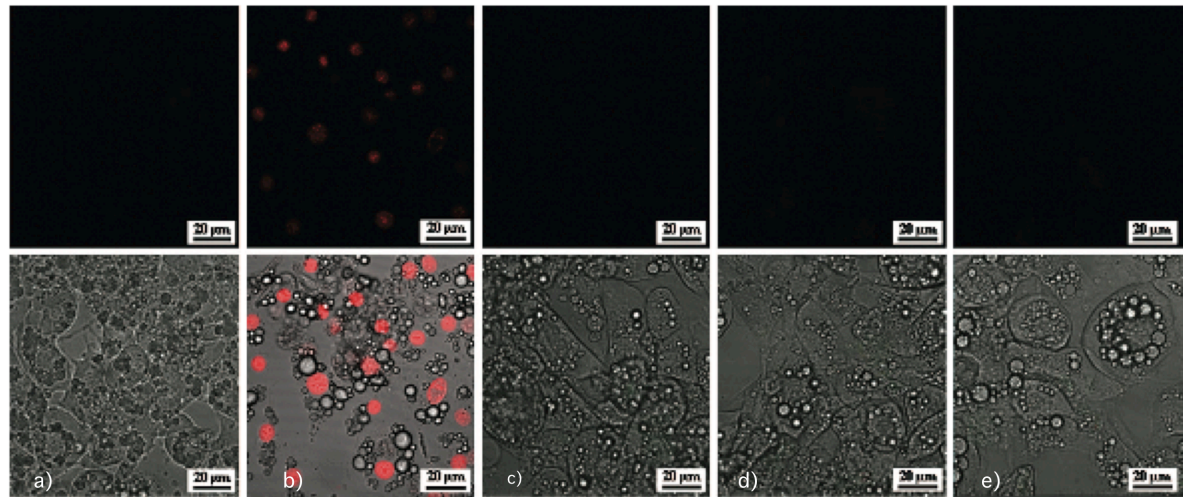


Abb. 11: Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid zum Nachweis nekrotischer Zellen unter dem konfokalen Mikroskop (n=3). Obere Reihe zeigt die rot fluoreszierenden Zellen, untere Reihe zeigt die korrespondierenden Phasenkontrast Bilder. (Balken=20 µm, Vergrößerung 63x) . a) Negativ-Kontrolle, b) Positivkontrolle mit Triton x, c) 1 mg/ml Phosphatidylcholin, d) 5 mg/ml Phosphatidylcholin, e) 10 mg/ml Phosphatidylcholin. Unter keiner der getesteten Phosphatidylcholinkonzentrationen lässt sich eine Fluoreszenz der exponierten Zellen nachweisen. Die intakten Zellmembranen verhindern ein Vordringen des Propidiumjodids bis zum Zellkern.

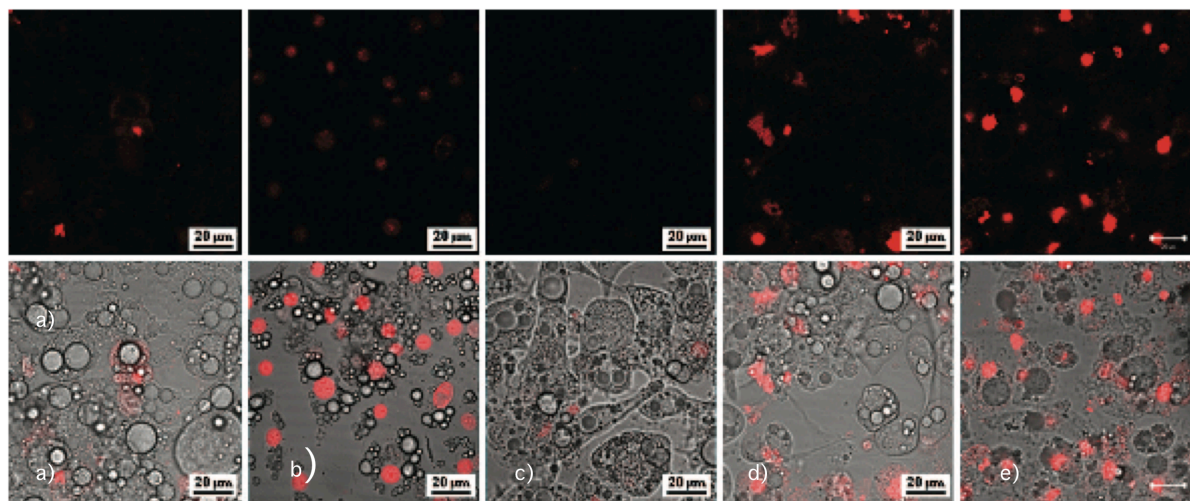


Abb. 12: Fluoreszenzfärbung mit Propidiumjodid zum Nachweis nekrotischer Zellen unter dem konfokalen Mikroskop (n=3). Obere Reihe zeigt die rot fluoreszierenden Zellen, untere Reihe zeigt die korrespondierenden Phasenkontrast Bilder. (Balken=20 µm, Vergrößerung 63x) . a) Negativ-Kontrolle, b) Positivkontrolle mit Triton x, c) 0,1 mg/ml Desoxycholat, d) 0,05 mg/ml Desoxycholat, e) 0,10 mg/ml Desoxycholat. Unter allen getesteten Desoxycholatkonzentrationen zeigen sich die fluoreszierende Zellkerne der exponierten Zellen. Mit Zunahme der Desoxycholatkonzentration nimmt auch die Anzahl fluoreszierender Zellkerne zu. Die zerstörten Lipiddoppelmembranen ermöglichen ein Vordringen des Propidiumjodids zum Zellkern.

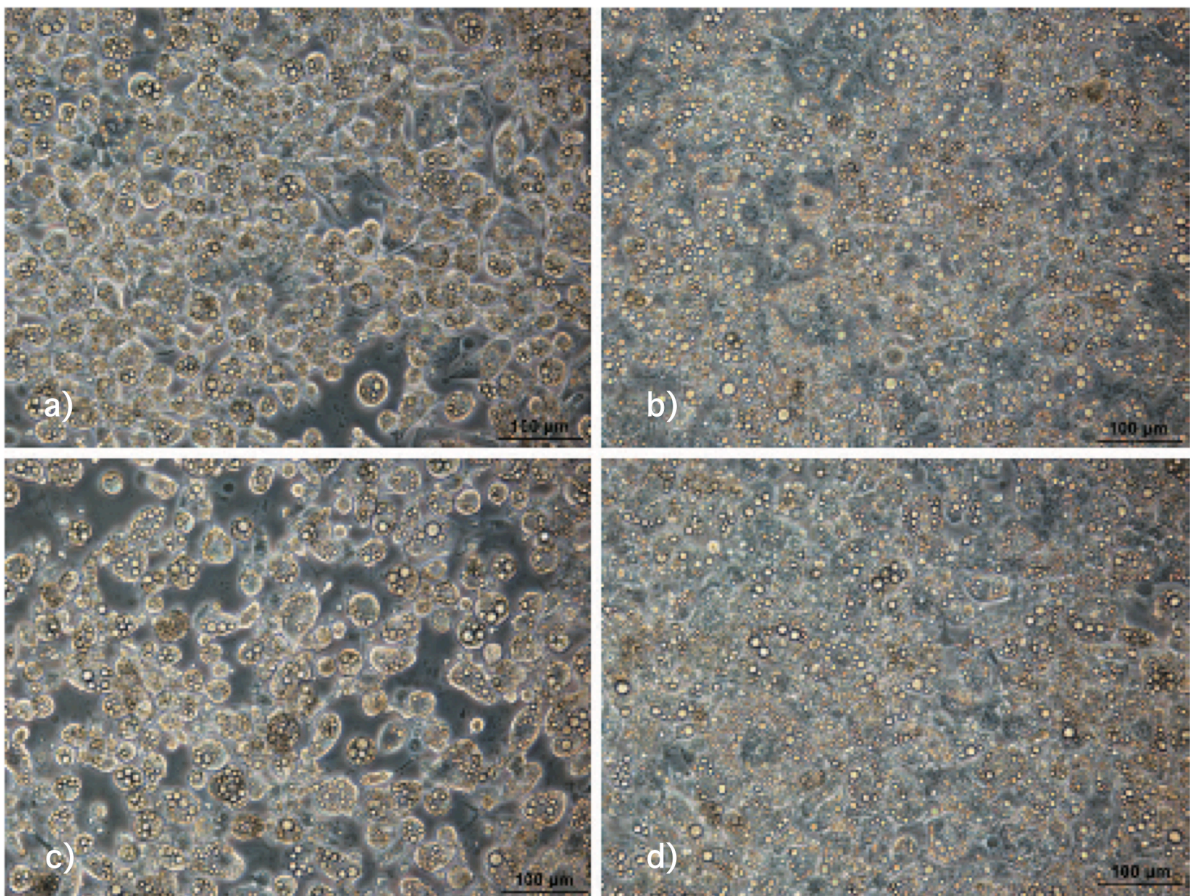


Abb. 13: Aufnahmen der Nativmikroskopie 6 Stunden nach Inkubation (Vergrößerung 60x). a) Negativ-Kontrolle, b) Positivkontrolle (Triton x), c) 10 mg/ml Phosphatidylcholin, d) 0,10 mg/ml Desoxycholat. Während die Zellmembranen in a) und b) intakt erscheinen sind in c) und d) keine Zellgrenzen auszumachen. Dies unterstützt die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie mit Propidiumjodid in Abb. 10 und 11.

5. Diskussion

Bedingt durch seinen Lipidcharakter lässt sich Phosphatidylcholin in wässrigem Milieu nicht lösen. Da in diesem Experiment unter anderem die lipolytische Aktivität von Phosphatidylcholin isoliert von seinem Lösungsmittel Desoxycholat beurteilt werden sollte, galt es, Phosphatidylcholin in einer alternativen Substanz zu lösen, welche selbst einen möglichst geringen Einfluss auf den Stoffwechsel des Adipozytenmodells zeigt. Es zeigte sich, dass Phosphatidylcholin in 70%igem Ethanol löslich ist, während das Ethanol selbst wiederum keine messbare lipolytische oder zelllytische Aktivität aufwies (Abb. 9-12). Daher ist den Negativkontrollen in allen Experimenten Ethanol, in Konzentrationen äquivalent den höchsten zu testenden Phosphatidylcholinkonzentrationen, zugesetzt.

Die Evaluation der Lipolyseaktivität zeigte neben der Positivkontrolle lediglich unter Phosphatidylcholin in der Konzentration 1,0 mg/ml einen signifikanten Anstieg. Diese Induktion von Lipolyse ist in Anbetracht der basalen Lipolyseaktivität unter der nächst höheren getesteten Phosphatidylcholinkonzentration als zufälliges Ereignis zu werten. In diesen Experimenten handelt es sich um Adipozyten in unterschiedlichen Stoffwechselstadien, eine zufällige Erhöhung einzelner Parameter ist nicht auszuschließen; zudem ist eine Induktion einer Lipolysekaskade unter 1,0 mg/ml Phosphatidylcholin, welche weder unter 0,5 mg/ml noch unter 1,5 mg/ml auftritt, schwer denkbar (Abb. 9). Ein möglicher Phosphatidylcholinrezeptor müsste demnach auch bei der nächst höheren Konzentration ansprechen. Somit muss die Hypothese einer Induktion von biochemischer Lipolyse durch Phosphatidylcholin abgelehnt werden.

Die Messung der Zellviabilität wies sowohl unter Desoxycholat als auch unter Lipostabil signifikante bzw. hochsignifikante Abnahmen an lebenden Zellen auf. Kein vergleichbarer Zelluntergang konnte jedoch für isoliertes Phosphatidylcholin nachgewiesen werden (Abb. 10). Es muss also von einem induzierten Zelltod durch Desoxycholat ausgegangen werden, welcher wiederum den massiven Zelluntergang unter Lipostabil® erklärt - wie bereits beschrieben enthält Lipostabil® Desoxycholat als Lösungsmittel für Phosphatidylcholin. Somit nahe, dass es zu einem Zelluntergang nach subkutaner Applikation von Lipostabil® kommt.

Die Anfärbung mit Propidiumjodid nach Desoxycholatexposition beweist die Zerstörung der Zellmembranintegrität ab einer Konzentration von 0,05 mg/ml Desoxycholat (Abb. 12). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der in den MTT-Assays zu beobachtende Zelluntergang durch eine detergentielle Auflösung der Zellmembranen, vermittelt durch das in Lipostabil® enthaltene Desoxycholat,

bedingt ist. Die Beobachtungen von verwaschenen Zellgrenzen unter 0,10 mg/ml Desoxycholat unter dem Lichtmikroskop bestätigen diese Hypothese (Abb. 13).

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse der in-vitro Studien zum Effekt von subkutan appliziertem Lipostabil® geben keinen Anhalt für die Induktion einer biochemischen Lipolyse. Zwar zeigt sich unter Phosphatidylcholin in der Konzentration 1,0 mg/ml eine signifikante Lipolyse, aber dieser Effekt ist, wie bereits diskutiert, am ehesten auf eine zufällig erhöhte lipolytische Aktivität dieser Zellen zurückzuführen. Entscheidend ist zudem, dass sich unter Lipostabil® keinerlei Lipolyse zeigte. Somit muss die Hypothese einer Lipolyseinduktion durch subkutan verabreichtes Lipostabil® abgelehnt werden. Auch für den eigentlichen Wirkstoff Phosphatidylcholin erscheint eine Lipolyseinduktion fraglich.

Doch woher kommt die vielfach beschriebene Volumenreduktion im subkutanen Fettgewebe nach der Lipostabil®-Therapie? Die Abnahme der Zellviabilität unter Desoxycholat und Lipostabil®, sowie die Ergebnisse der Propidiumjodidfluoreszenzmikroskopie legen folgenden Mechanismus nahe: Desoxycholat als das eigentliche Lösungsmittel für Phosphatidylcholin in Lipostabil® bewirkt eine lytische Trennung der Zellmembranen im Sinne einer Detergenzwirkung. Diese Membranlyse bewirkt den Untergang der Adipozyten und somit schließlich eine mittelfristige Abnahme des Unterhautfettgewebes. Es ist schlussendlich also von einer induzierten Lyse von Zellmembranen durch die subkutane Injektion von Lipostabil® auszugehen. Diese Annahme passt zu der klinischen Beobachtung von Rötung und Überwärmung als Entzündungszeichen nach der subkutanen Anwendung von Lipostabil®¹⁴. Schließlich muss kritisch hinterfragt werden, in wie weit diese Lyse spezifisch auf die Zellmembranen von Adipozyten beschränkt ist. Deshalb sollte die Anwendung von Lipostabil® im Off-Label-Use nur unter kritischer Indikationsstellung und unter Kenntnis der Risiken und Grenzen dieser Therapie angewendet werden.

In Vitro Studies Investigating the Effect of Subcutaneous Phosphatidylcholine Injections in the 3T3-L1 Adipocyte Model: Lipolysis or Lipid Dissolution?

Silvan M. Klein
Stephan Schreml, M.D.
Michael Nerlich, M.D., Ph.D.
Lukas Prantl, M.D., Ph.D.

Regensburg, Germany

Background: The demand for lipolytic injection therapies for aesthetic indications increases continuously. The substance most frequently discussed in this context is phosphatidylcholine solubilized in sodium deoxycholate, a composition known in Europe as Lipostabil (Artesan Pharma, Lüchow, Germany). The evidence for its lipolytic effect is based mainly on clinical studies that suggest a decrease in adipose tissue volume after subcutaneous injections. However, neither the actual effect nor the effective supplemental effect of Lipostabil has been clearly identified so far. The purpose of this study was to investigate the effects caused by lipolytic formulations on adipocytes using an in vitro model.

Methods: 3T3-L1 adipocytes in 12-well plates were exposed to varying doses of isolated phosphatidylcholine, deoxycholate, and the combination of both (Lipostabil). Subsequently, changes in the cell membrane integrity were evaluated microscopically, and assays measuring the amount of glycerol as a biochemical lipolysis substrate (lipolysis assay) together with dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium assays were performed to quantify the lipolytic effect and the cell viability.

Results: Deoxycholate reduced cell viability significantly ($p < 0.05$), even at low concentrations. Neither phosphatidylcholine nor deoxycholate led to a significant ($p < 0.05$) induction of a lipolytic pathway. Lipostabil, the combination of deoxycholate and phosphatidylcholine, led to a significant ($p < 0.05$) decrease in cell viability at low doses and to a highly significant ($p < 0.01$) reduction at high doses. The loss in cell viability is attributable to changes in the cell membrane integrity.

Conclusions: These results suggest that no enzymatic lipolytic pathway is induced. The decrease in volume after Lipostabil injections is likely attributable to the detergent effect of deoxycholate. (*Plast. Reconstr. Surg.* 124: 419, 2009.)

Originally, Lipostabil (Artesan Pharma, Lüchow, Germany) was introduced in the 1960s as an intravenous medication to prevent or treat fat embolism. This substance consists mainly of lipid phosphatidylcholine dissolved in the bile salt deoxycholate.^{1,2} Considering that this medication was developed for another indication (fat embolism) and for intravenous application only, it is hardly surprising that there is a paucity of knowledge regarding the effect(s) caused by its subcutaneous injection. Because of publications

regarding its fat-reducing effect, the subcutaneous injection of Lipostabil has become a popular alternative to liposuction over the past few years.³⁻⁸

The term “lipolysis” necessitates differentiation between the biochemical mechanism behind lipolysis and the simple lysis of cell membranes. The biochemical mechanism behind lipolysis is

From the Department of Traumatology, Division of Plastic Surgery, and the Department of Dermatology, University Hospital of Regensburg.

Received for publication October 7, 2008; accepted February 9, 2009.

Copyright ©2009 by the American Society of Plastic Surgeons

DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181adce61

Disclosure: None of the authors or their family members have or have had a relationship to a commercial enterprise or individual, nor do or did the authors receive stock options, financial support, or other valuable materials in conjunction with this study. No equipment, material, or medication was loaned, given, or offered for reduced prices for this study.

mediated by adrenergic β_1 and α_2 receptors; together with hormones such as glucagon and insulin, the mediator cyclic adenosine monophosphate is induced. This nucleotide then activates lipases that hydrolyze the triglycerides into glycerol and free fatty acids.⁹ In contrast, the detergent-induced lyses of cell membranes are not mediated by receptors. More accurately, this type of lipolysis is the dissolution of the lipid bilayer into micelles, caused by molecules with hydrophilic and lipophilic features.^{10,11} The overall clinical "lipolytic" effect is likely to be similar, and has been reported numerous times as a decrease in adipose tissue volume.^{3-7,9} Both definitions of lipolysis have been suggested to be the reason for the decrease in volume caused by injecting Lipostabil in the subcutaneous fatty tissue.^{7,12}

In this study, our aim was to determine in an *in vitro* setting how phosphatidylcholine, deoxycholate, or the synergism of both can cause a reduction in volume of adipose tissue. Furthermore, we aimed to investigate whether the treated adipocytes react to the treatment with simple cell death or by inducing a pathway of lipolytic enzymes that split intracellular lipids.

To answer these queries, an *in vitro* adipocyte model was exposed to either phosphatidylcholine, deoxycholate, or phosphatidylcholine that was dissolved in deoxycholate (Lipostabil) in varying doses. Subsequently, assays were performed to measure whether a lipolytic enzymatic pathway was induced and to quantify what proportion of the cells underwent cell death. In addition the cells were stained to evaluate changes in the membrane structure under the microscope.

MATERIALS AND METHODS

Lipostabil N 5 ml (50 mg/ml) intravenously consists of its active substance being 250 mg of soy-derived phospholipids (93% phosphatidylcholine), solubilized in 126.50 mg of deoxycholate, supplemented by 4539 mg of water, 45 mg of benzyl alcohol (for preservation), 18 mg of sodium chloride, 15 mg of ethanol, 12.65 mg of sodium hydroxide, and 0.75 mg of DL- α -tocopherol (vitamin E). It was purchased from Artesan Pharma (Luechow, Germany). Pure phosphatidylcholine was acquired from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Ethanol (99%) for the solubilization solution was delivered by Mallinckrodt Baker (Griesheim, Germany). Triton X and deoxycholate were obtained from Fluka Analytical (Seelze, Germany).

Murine 3T3-L1 preadipocytes were obtained from American Type Culture Collection (Manas-

sas, Va.). Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetal bovine serum, and trypsin (1:250) were purchased from Seromed Biochrom KG (Berlin, Germany); phosphate-buffered saline and penicillin-streptomycin were obtained from Life Technologies (Karlsruhe, Germany). Alpha minimal essential medium (alpha modification), corticosterone, indomethacin, and propidium iodide were produced by Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany); 3-isobutyl-1-methylxanthine was purchased from Serva Electrophoreses GmbH (Heidelberg, Germany); and insulin was provided by Hoechst (Frankfurt, Germany). Cell culture materials were obtained from Sarstedt AG and Co. (Nuembrecht, Germany). The lipolysis assay kit was purchased from Zen-Bio, Inc. (Research Triangle Park, N.C.). The dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium (MTT) assay was produced by AppliChem (Darmstadt, Germany).

Cell Culture

3T3-L1 preadipocytes were plated in 12-well plates at a density of 5000 cells/cm². The preadipocytes were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin (100 U/ml) together with streptomycin (0.10 mg/ml). Every 2 days, the preadipocytes were washed in phosphate-buffered saline; the medium was always changed at the same time.

Four days after plating, adipogenesis was induced by applying induction medium (0.1 μ M corticosterone, 0.50 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 60 μ M indomethacin, 5% fetal bovine serum, 1 μ M insulin, penicillin at 100 U/ml, and streptomycin at 0.10 mg/ml in alpha minimal essential medium). After 2 days, the induction medium was replaced by the differentiation medium (1 μ M insulin, 5% fetal bovine serum, penicillin at 100 U/ml, and streptomycin at 0.10 mg/ml in alpha minimal essential medium). All experiments were performed on day 10 of the differentiation period.

Measurement of Lipolysis

3T3-L1 adipocytes were cultivated in 12-well plates. In preparation for the experiment, the cells were washed in phosphate-buffered saline, and the differentiation medium was replaced by phosphate-buffered saline 2 hours in advance. The β -agonist isoprenaline was used to induce lipolysis to have a positive control in this assay. Pure phosphate-buffered saline/bovine serum albumin served as the negative control for this experiment. Ethanol,

phosphatidylcholine, and Lipostabil were tested separately for their ability to cause lipolysis. To determine the effect after exposure to each of the substances, the cells were incubated (37°C, 5% carbon dioxide) for 4 hours, with varying concentrations of the substances (Figs. 1 and 2) and phosphate-buffered saline, which is free of fatty acids. Subsequently, the cells were separated from the phosphate-buffered saline and the investigated substance. Phosphatidylcholine itself showed a drastic influence on absorbance. Therefore, the samples had to be filtered with 0.20- μ m filters to extract the phosphatidylcholine before photometric measurements. The amount of DNA in each well was measured to obtain a reference for the number of cells included in each well, as recommended by the manufacturer. The samples (phosphate-buffered saline together with the investigated substance) were mixed with GPO-Trinder A (Sigma-Aldrich), an enzyme that produces qui-

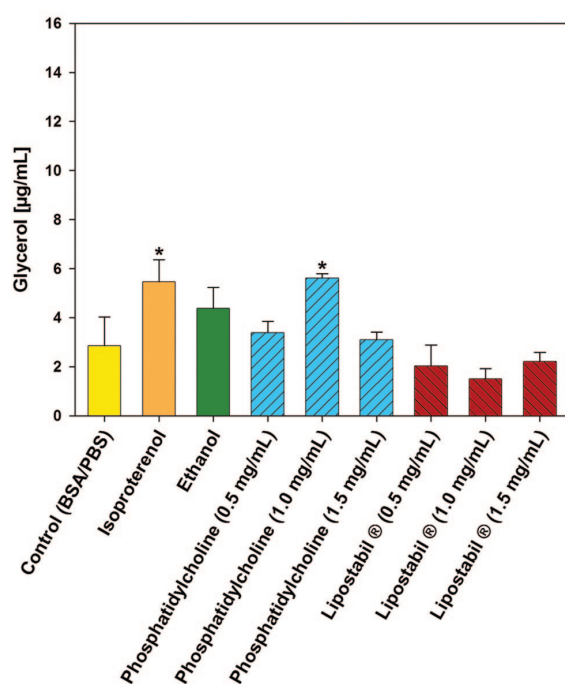


Fig. 1. Lipolysis assay with 3T3-L1 adipocytes ($n = 3$). The rise of glycerol indicates the induction of a lipolytic catabolism inside the adipocytes. The lipolysis assay demonstrates a significant rise of glycerol for the positive control, but neither phosphatidylcholine, deoxycholate, nor the combination of both (Lipostabil) was able to induce significant lipolysis. The negative control was bovine serum albumin (BSA)/phosphate-buffered saline (PBS); the positive control was isoproterenol. The vertical bars and T bars represent means \pm SD; *statistically significant ($p < 0.05$).

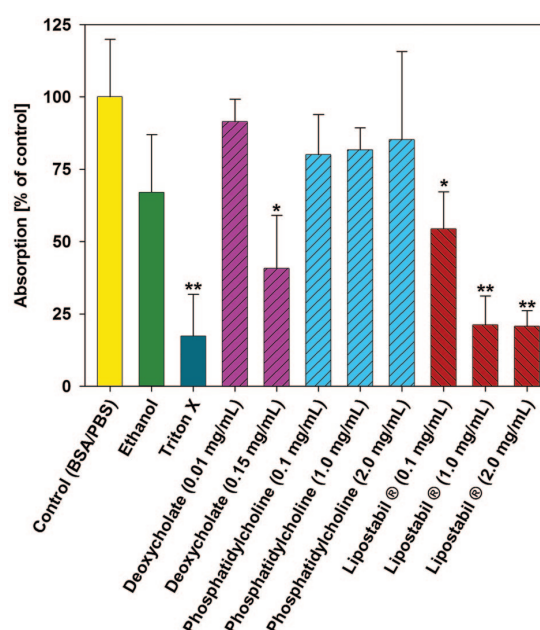


Fig. 2. MTT assay with 3T3-L1 adipocytes ($n = 3$). The loss of absorption reflects the amount of dead cells. MTT assay showed a significant loss in cell viability for neither phosphatidylcholine nor ethanol used as a solubilizer. Deoxycholate and Lipostabil led to a significant loss in cell viability of adipocytes, even at concentrations of 0.15 mg/mL. A highly significant reduction in cell viability was detected in bovine serum albumin concentrations of Lipostabil starting from 1.0 mg/mL. The negative control was bovine serum albumin (BSA)/phosphate-buffered saline (PBS); the positive control was Triton X. The vertical bars and T bars represent means \pm SD; *statistically significant ($p < 0.05$); **highly significant ($p < 0.01$).

noneimine dye out of glycerol in several steps. At 540 nm, quinoneimine dye increases the absorbance in the photometer directly proportional to the glycerol concentration in the sample.

Measurement of Cell Viability

Cell viability was determined using the MTT assay, which consists of a tetrazolium-based change in the photometric extinction resulting from a bio-reduction by mitochondrial enzymes of metabolically active (living) cells. The change in viability can be quantified by the extinction in a spectrophotometer at 490-nm wavelength.

3T3-L1 adipocytes were cultivated in 12-well plates (for details, see earlier under Cell Culture). In preparation of the experiment, the differentiation medium was replaced by phosphate-buffered saline 2 hours in advance. After 2 hours, the cells were incubated with phosphatidylcholine, de-

oxycholate, or Triton X (1%), which is a laboratory detergent used as the negative control for cell viability experiments. The incubation was performed for 4 hours (37°C, 5% carbon dioxide). Subsequently, the MTT agent was added and the assay was performed according to the manufacturer's instructions.

Propidium Iodide Staining

Propidium iodide stains DNA but is not able to penetrate the intact bilayers of cell membranes. Therefore, only those cells without an intact cell membrane are stained. In our experiments, the staining was used to evaluate the cell membrane integrity of the exposed cells. The cells were incubated with varying concentrations of the isolated substances (Figs. 3 and 4) for 4 hours (37°C, 5% carbon dioxide). Subsequently, the cells were exposed to propidium iodide (5 μ g/ml), which was documented under a confocal laser scanning microscope with 63 \times magnification.

Statistical Analysis

All analyses were performed using SigmaPlot and SigmaStat (SPSS, Inc., Chicago, Ill.). Data are given as mean \pm SD of three cultures. For each culture, three samples were measured. A *t* test was used to verify differences between glycerol levels under different lipolytic stimuli and respective controls. No correction was made for multiple testing. Values of $p < 0.05$ were considered significant, values of $p < 0.01$ were considered highly significant, and corresponding results were marked using one (significant) or two asterisks (highly significant) within the graphs, respectively. One adipocyte culture intended for the measurement of glycerol levels under 1.50 mg/ml Lipostabil did not grow; thus, $n = 2$ for that particular measurement.

RESULTS

Lipolysis Assay

The lipolysis assay with 3T3-L1 adipocytes showed glycerol amounts of 2.86 ± 1.17 μ g/ml in the bovine serum albumin/phosphate-buffered saline control (negative control) (Fig. 1). The isoprenaline samples showed a significant rise to 5.46 ± 0.91 μ g/ml ($p < 0.05$) of glycerol, which was the positive control in this experiment (for details, see earlier under Measurement of Lipolysis). For all other tested substances, no significant rise of glycerol could be measured.

MTT Assay

Under controlled conditions, the MTT reaction of 3T3-L1 adipocytes amounted to 100 ± 19.90 percent (Fig. 2). Triton X (positive control) led to a highly significant reduction of the extinction to 17.28 ± 14.50 percent ($p < 0.01$). Of the investigated drugs, 0.15 mg/ml deoxycholate significantly reduced the extinction to 40.75 ± 18.37 percent ($p < 0.05$). Lipostabil 0.10 mg/ml reduced the extinction significantly to 54.36 ± 12.85 percent ($p < 0.05$), and at a concentration of 1 mg/ml, Lipostabil led to a highly significant reduction to 21.16 ± 9.97 percent ($p < 0.01$). The ethanol control did not show any significant reduction of the extinction in the cell viability assay (78.15 ± 6.76 percent).

DISCUSSION

Phosphatidylcholine has been in use for several indications ranging from the prevention of fat embolism to the reduction of serum triglycerides and even for the prevention of fibrosis in damaged livers.^{13,14} Multiple clinical trials support the idea that subcutaneously injected phosphatidylcholine leads to a reduction in volume of adipose tissue.³⁻⁸

These facts have led to controversial theories concerning the role of the molecule phosphatidylcholine in the formulations used for subcutaneous injections. One theory states that—because of its bipolar character—phosphatidylcholine dissolves the fatty tissue by breaking the cell membrane lipid bilayer into micelles.¹⁵⁻¹⁷ Another published theory suggests that the induction of lipases by phosphatidylcholine causes a catabolic pathway ending in a liver metabolism.⁷ Recently, Rotunda et al. concluded that phosphatidylcholine is not the active substance in injectable formulations for subcutaneous lipolysis.¹² The authors found a similar volume-reducing effect on keratinocyte cells and porcine skin after injection of plain sodium deoxycholate—a bile salt that acts as a solubilizer for phosphatidylcholine in water—isolated from phosphatidylcholine.

Our first objective was to investigate whether phosphatidylcholine—when isolated from deoxycholate—has a lipolytic effect on adipocytes as previously postulated.⁷ Thus, it was necessary to identify a solubilizer for phosphatidylcholine other than deoxycholate. Phosphatidylcholine can be solubilized in low concentrations of ethanol. To ensure that ethanol as the solvent agent does not have any relevant effect on the lipolytic activity or viability of adipocytes, one group was

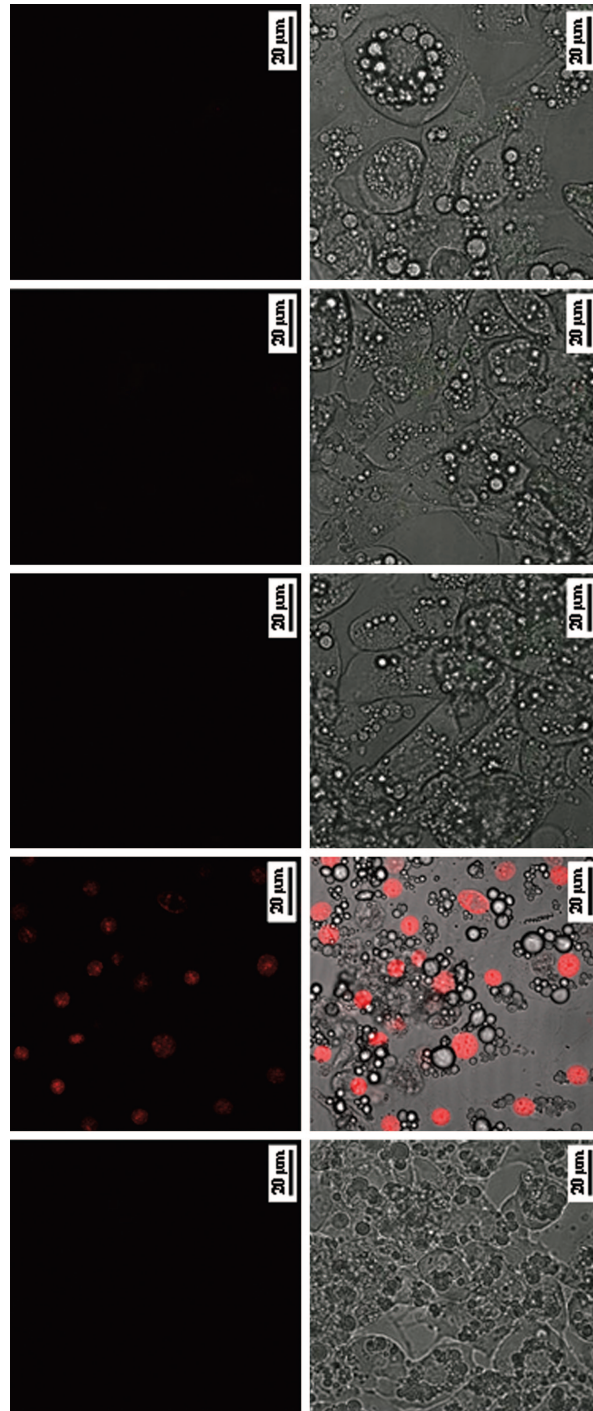


Fig. 3. Propidium iodide staining for the analysis of necrotic cell death by confocal microscopy ($n = 3$). (Above) The stained cells are shown in red; (below) the corresponding phase-contrast images (scale bar = 20 μm ; original magnification, $\times 63$). (First column) Negative control (ethanol); (second column) positive control (Triton X); (third column) 1 mg/ml phosphatidylcholine; (fourth column) 5 mg/ml phosphatidylcholine; (fifth column) 10 mg/ml phosphatidylcholine. It can be seen that throughout the entire range of concentrations hardly any cells are stained by propidium iodide. Even at a concentration of 10 mg/ml phosphatidylcholine, no cells are stained, indicating the intactness of the cellular membrane bilayer.

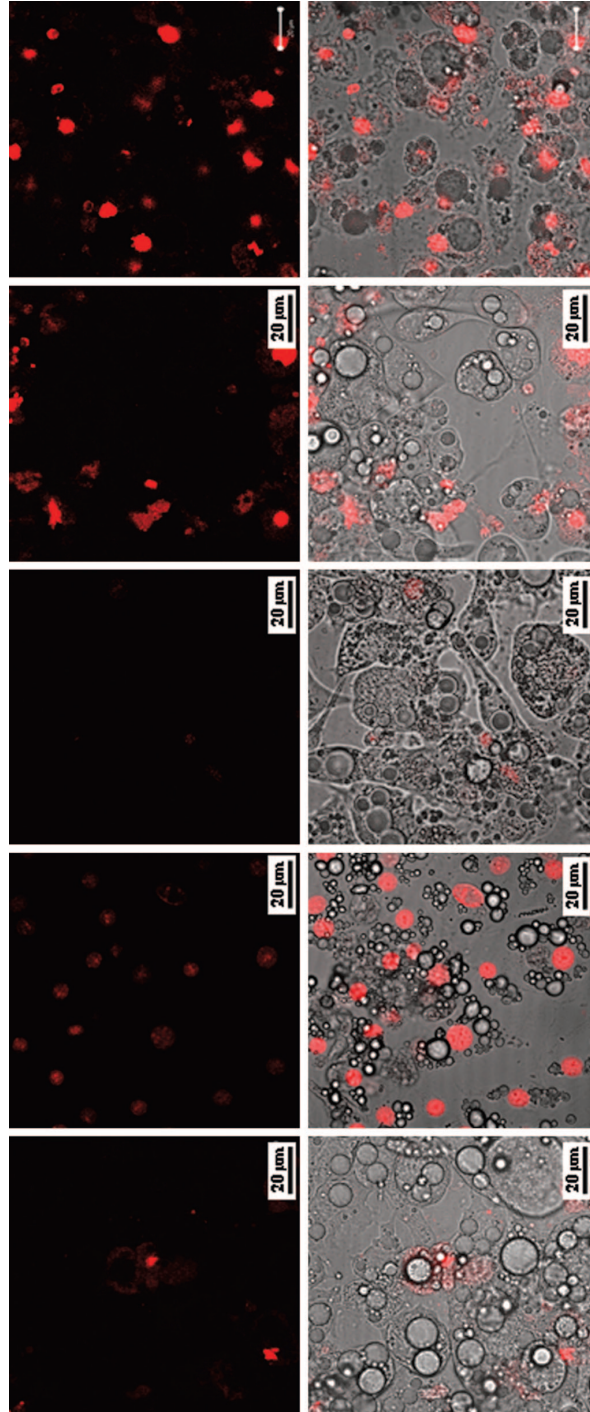


Fig. 4. Propidium iodide staining for the analysis of necrotic cell death by confocal microscopy ($n = 3$). (Above) The stained cells are shown in red; (below) the corresponding phase contrast images (scale bar = 20 μm ; original magnification, $\times 63$). (First column) Negative control (ethanol); (second column) positive control (Triton X); (third column) 0.01 mg/ml deoxycholate; (fourth column) 0.05 mg/ml deoxycholate; (fifth column) 0.10 mg/ml deoxycholate. It can be seen that the number of cells stained by propidium iodide increases with the increasing dose of deoxycholate. At a concentration of 0.10 mg/ml deoxycholate, almost all cells are stained because of the damage to the cellular membrane bilayer.

treated with pure ethanol in each assay (Figs. 1 through 3, *first column*). The ethanol concentration was chosen equal to the highest concentration needed for the phosphatidylcholine solubilization in our experiments. The ethanol control showed neither a significant lipolytic effect nor a significant reduction of the extinction in the cell viability assay (Figs. 1 and 2). Furthermore, no effect could be observed with pure ethanol in the group stained with propidium iodide (Fig. 3, *first column*). The lipolysis assay proved a significant rise of glycerol for the positive control (Fig. 1), but neither phosphatidylcholine, deoxycholate, nor the combination of both (Lipostabil) induced lipolytic pathways. This effect was reproduced throughout the entire range of concentrations. These results suggest that phosphatidylcholine does not induce any endogenous lipases. Thus, we cannot support the theory of phosphatidylcholine

acting as an inductor of an enzymatic lipolytic pathway.

As mentioned above, Rotunda et al. demonstrated a detergent effect of phosphatidylcholine solubilized in deoxycholate for keratinocyte cells.¹² Considering these data, the purpose of this study was to determine whether this detergent effect can also be detected in the adipocyte in vitro model used in our studies. Moreover, our objective was to investigate whether phosphatidylcholine has the same detergent effect caused by its bipolar structure when being applied isolated from deoxycholate. To demonstrate whether the cell viability of adipocytes is influenced by isolated phosphatidylcholine, the MTT assay and propidium iodide stainings together with native microscope image analysis were performed. The MTT assay showed no significant loss in cell viability for phosphatidylcholine or for the ethanol

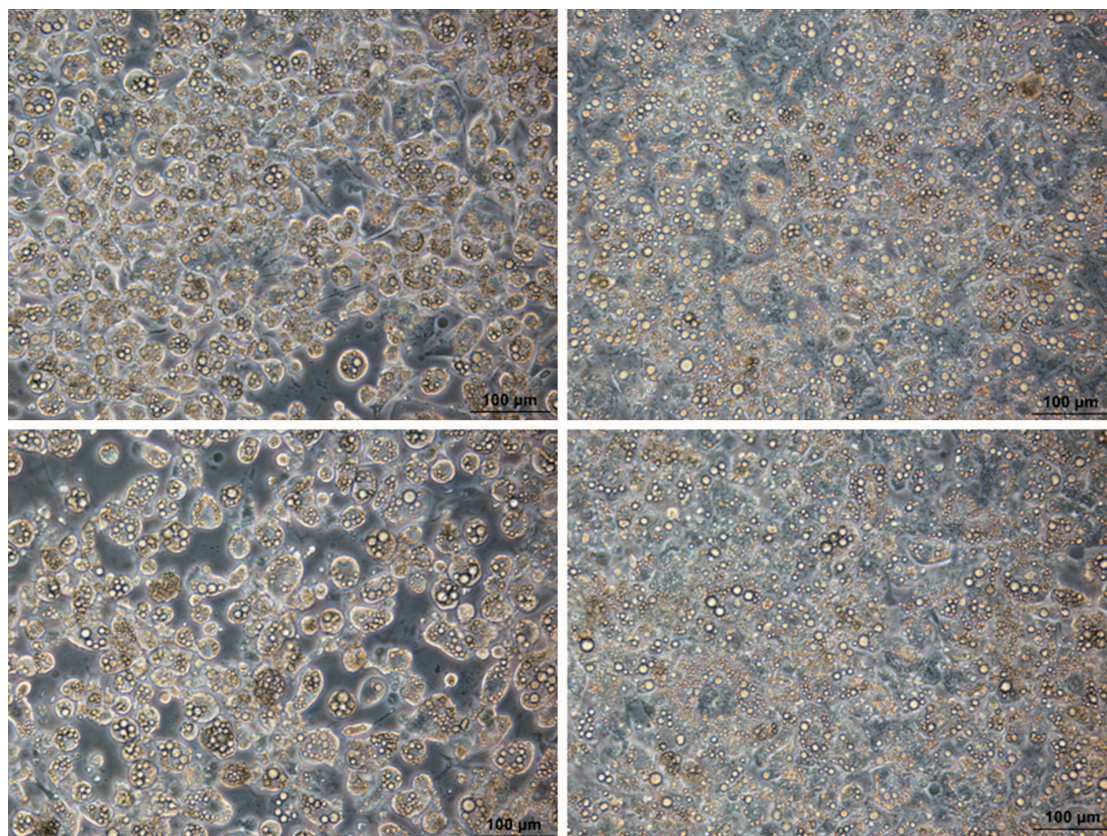


Fig. 5. Native microscopic images of adipocytes after 6 hours of incubation (original magnification, $\times 60$). (*Above, left*) Negative control (ethanol); (*above, right*) positive control (Triton X); (*below, left*) 10 mg/ml phosphatidylcholine; (*below, right*) 0.10 mg/ml deoxycholate. (*Left*) The cell membranes seem to be intact. (*Right*) A strong loss of cell barriers can be seen. These findings confirm the results of the propidium iodide stainings in Figures 3 and 4.

formulation, which served to solubilize phosphatidylcholine in this study (Fig. 2). In contrast, deoxycholate and Lipostabil had already begun to result in a significant loss in adipocyte cell viability at concentrations of 0.15 mg/ml or lower (Fig. 2). This loss was highly significant for concentrations of Lipostabil at or above 1 mg/ml (Fig. 2). The decrease in viability with Lipostabil is likely attributable to the detergent effect of deoxycholate described by Rotunda et al., because phosphatidylcholine exhibited no such effect at equivalent doses in the MTT assay (Fig. 2).¹² Although the MTT assay does not enable us to conclude by what specific mechanism cell death has been induced (apoptosis or necrosis), it is likely—together with the propidium iodide staining and the native microscope images—that the cell death is a result of the detergent effect of deoxycholate (Figs. 4, *fourth* and *fifth columns* and 5, *below, right*).

The Lipostabil formula contains low amounts of benzyl alcohol for antimicrobial reasons. Although an effect of benzyl alcohol on the fluidity of cell membranes has been reported, we did not isolate this benzyl alcohol because of its small quantity in the formula.^{18,19} The described lipolysis assay supports the theory that detergents are the major feature of injectable phosphatidylcholine formulations, because no parameters for lipolysis occurred with phosphatidylcholine, deoxycholate, or Lipostabil (which is the combination of both mentioned substances) (Fig. 1).¹² The performed MTT assays proved a significant loss in viability for deoxycholate and Lipostabil at doses where phosphatidylcholine alone did not show any effect (Fig. 2). The results of the MTT assay together with the propidium iodide stainings confirm observations published in clinical trials that revealed local inflammatory reactions such as erythema, pain, and edema, most likely caused by cell membrane destruction.²⁰

CONCLUSIONS

Our findings suggest that neither phosphatidylcholine nor sodium deoxycholate induces an enzymatic lipolytic pathway (Fig. 1). Deoxycholate reduces the cell viability already at low doses (0.15 mg/ml) (Fig. 2). Phosphatidylcholine neither significantly influences the cell viability nor starts to cause membrane destruction at the tested doses (Figs. 2 and 4), whereas Lipostabil demonstrated a highly significant effect on cell viability at a concentration of only 1 mg/ml (Fig. 2). This comparably strong effect could be related to a synergistic effect of phosphatidylcholine or the

benzyl alcohol in the Lipostabil formula. The propidium iodide stainings and native microscope images prove that the detergent bile salt deoxycholate induces membrane destruction (Figs. 4, *fourth* and *fifth columns* and 5, *below, right*), thereby leading to cell death of exposed adipocytes (Fig. 2).


According to published clinical trials, the subcutaneous injection of phosphatidylcholine formulations appears to be an effective tool with which to reduce subcutaneous fatty tissue, although it has to be noted that the membrane destruction is most likely not restricted to adipocytes. Therefore, physicians should be well trained and cautious when injecting these substances. Further studies investigating the effect under in vivo conditions should be conducted to ensure the safety and efficacy of lipolytic formulations.

Lukas Prantl, M.D., Ph.D.

Department of Traumatology
Division of Plastic Surgery
University Hospital of Regensburg
Franz-Josef-Strauß-Allee 11
93042 Regensburg, Germany
lukas.prantl@klinik.uni-regensburg.de

REFERENCES

1. Lipostabil (package insert). Lüchow, Germany: Artesan Pharma; 2006.
2. Lipostabil. Cologne, Germany: Natterman International GmbH; 1990:9.
3. Rotunda AM, Kolodney MS. Mesotherapy and phosphatidylcholine injections clarification and review. *Dermatol Surg*. 2006;32:465–480.
4. Ablon G, Rotunda AM. Treatment of lower eyelid fat pads using phosphatidylcholine: Clinical trial and review. *Dermatol Surg*. 2004;30:422–427.
5. Rittes PG. The use of phosphatidylcholine for correction of localized fat deposits. *Aesthetic Plast Surg*. 2003;27:315–318.
6. Treacy PJ, Goldberg DJ. Use of phosphatidylcholine for the correction of lower lid bulging due to prominent fat pads. *J Cosmet Laser Ther*. 2006;8:129–132.
7. Hasengschwandtner F. Phosphatidylcholine treatment to induce lipolysis. *J Cosmet Dermatol*. 2005;4:308–313.
8. Salti G, Ghersetich I, Tantussi F, Bovani B, Lotti T. Phosphatidylcholine and sodium deoxycholate in the treatment of localized fat: A double-blind, randomized study. *Dermatol Surg*. 2008;34:60–66.
9. Lincová D, Miseková D, Hynie S. The effect of adrenotropic agents on lipolysis in rat adipose tissue; the effect of nonselective alpha adrenomimetics and alpha adrenolytics under in-vitro experimental conditions (in Czech). *Sb Lek*. 1991;93:351–363.
10. Womack MD, Kendall DA, MacDonald RC. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 1983;733:210–215.
11. Schuck S, Honnsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5795–5800.
12. Rotunda AM, Suzuki H, Moy R, Kolodney MS. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an

- 
- injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol Surg.* 2004;30:1001–1008.
13. Bobkova VI, Lokshina LI, Korkunskii V, Tananova GV. Metabolic effect of lipostabil-forte (in Russian). *Kardiologiia* 1989; 29:57–60.
 14. Lieber CS, Robins SJ, Li J, et al. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology* 1994;106:152–159.
 15. Durr M, Hager J, Lohr JP. Investigation on mixed micelle and liposome preparations for parental use on soy phosphatidylcholine. *Eur J Pharm Biopharm.* 1994;40:147–156.
 16. Hammad MA, Muller BW. Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;46:361–367.
 17. Lichtenberg D. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim Biophys Acta* 1985;821: 470–478.
 18. Ebihara L, Hall JE, McDonald RC, McIntosh TJ, Simon SA. Effect of benzyl alcohol on lipid bilayers: A comparison of bilayer systems. *Biophys J.* 1979;28:185–196.
 19. Gordon LM, Sauerheber RD, Esgate JA, Dipple I, Marchmont RJ, Houslay MD. The increase in bilayer fluidity of rat liver plasma membranes achieved by the local anesthetic benzyl alcohol affects the activity of intrinsic membrane enzymes. *J Biol Chem.* 1980;255:4519–4527.
 20. Yagima Odo ME, Cucé LC, Odo LM, Natrielli A. Action of sodium deoxycholate on subcutaneous human tissue: Local and systemic effects. *Dermatol Surg.* 2007;33:178–188.

8. Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

1. Klein, S.M., Schreml, S., Nerlich, M. & Prantl, L. In vitro studies investigating the effect of subcutaneous phosphatidylcholine injections in the 3T3-L1 adipocyte model: lipolysis or lipid dissolution? *Plast. Reconstr. Surg* **124**, 419-427 (2009).
2. Ramos, S., Pinheiro, S., Diogo, C., Cabral, L. & Cruzeiro, C. Madelung disease: a not-so-rare disorder. *Ann Plast Surg* **64**, 122-124 (2010).
3. Michalakakis, K. & Ilias, I. Medical management of adrenal disease: a narrative review. *Endocr Regul* **43**, 127-135 (2009).
4. Hasegawa, T., Matsukura, T. & Ikeda, S. Mesotherapy for benign symmetric lipomatosis. *Aesthetic Plast Surg* **34**, 153-156 (2010).
5. Berger, A. & Hierner, R. *Plastische Chirurgie: Grundlagen, Prinzipien, Techniken: Bd. 1.* (Springer, Berlin: 2002).
6. Thomas, M., Menon, H. & D'Silva, J. Surgical complications of lipoplasty - Management and preventive strategies. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* In Press, Corrected Proof,
7. Adamo, C., Vescio, G., Battaglia, M., Gallelli, G. & Musella, S. Madelung's disease: case report and discussion of treatment options. *Ann Plast Surg* **46**, 43-45 (2001).
8. Rittes, P.G. The use of phosphatidylcholine for correction of localized fat deposits. *Aesthetic Plast Surg* **27**, 315-318 (2003).
9. Rotunda, A.M., Suzuki, H., Moy, R.L. & Kolodney, M.S. Detergent effects of sodium deoxycholate are a major feature of an injectable phosphatidylcholine formulation used for localized fat dissolution. *Dermatol Surg* **30**, 1001-1008 (2004).
10. Stryer, L. *Biochemie.* (Spektrum Akademischer Verlag: 1996).
11. Jakubke, H. & Jeschkeit, H. *Fachlexikon ABC Chemie.* (Deutsch (Harri): 1987).
12. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983).
13. Dengler, W.A., Schulte, J., Berger, D.P., Mertelsmann, R. & Fiebig, H.H. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer Drugs* **6**, 522-532 (1995).
14. Yagima Odo, Cucé LC, Odo LM & Natrielli A. Action of sodium deoxycholate on subcutaneous huma... *Dermatol Surg* **33**, 178-188 (2007).

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1a - Signaltransduktion der biochemischen Lipolyse | 8 |
| Abbildung 1b - Schematische Darstellung des Triacylglyceridstoffwechsels | 9 |
| Abbildung 2 - Schematische Darstellung der Membranlyse durch ein Detergenz | 10 |
| Abbildung 3 - Strukturformel des Phosphatidylcholinmoleküls | 11 |
| Abbildung 4 - Strukturformel des Desoxycholatsalzes | 11 |
| Abbildung 5 - Differenzierungsstadien von 3T3-L1-Zellen | 13 |
| Abbildung 6 - Enzymkaskade des Lipolyse-Assay | 14 |
| Abbildung 7 - Schematische Darstellung des MTT-Assays | 15 |
| Abbildung 8 - Schematische Darstellung zur Wirkungsweise von Propidiumjodid .. | 16 |
| Abbildung 9 - Balkendiagramm Lipolyse-Assay | 18 |
| Abbildung 10 - Balkendiagramm MTT-Assay | 19 |
| Abbildung 11 - Mikroskopische Aufnahmen unter Phosphatidylcholin mit Propidiumjodid | 21 |
| Abbildung 12 - Mikroskopische Aufnahmen unter Desoxycholat mit Propidiumjodid | 21 |
| Abbildung 13 - Mikroskopische Nativ-Aufnahmen unter Phosphatidylcholin und Desoxycholat | 21 |

9. Anhang

9.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Lukas Prantl, der mich während meiner gesamten wissenschaftlichen Arbeit mit seinen fundierten Kenntnissen, guten Ideen und aufbauenden Worten jederzeit unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für Probleme und Schwierigkeiten hatte.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. Annina Seitz, die mich mit guten Ratschlägen und tatkräftiger Unterstützung bei meinem Experimenten begleitet hat.

Außerdem möchte ich PD Dr. Torsten Blunk für seine konstruktiven Ratschläge und seine fundierten wissenschaftlichen Anmerkungen zu allen Ergebnissen dieser Experimente danken.

Darüber hinaus danke ich dem gesamten Lehrstuhl für pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. A. Göpferich, deren Laborflächen ich für meine Experimente nutzen durfte, und für die gute Zusammenarbeit und den allzeit freundschaftlichen Umgang.

Schließlich gilt mein Dank auch Herrn Prof. M. Nerlich für die Gelegenheiten meine Ergebnisse bei vielen Wissenschaftswochenenden zu präsentieren und zu diskutieren, sowie die stets anerkennenden Worte über meine Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich immer wieder zu motivieren wussten.

9.2 Lebenslauf

Am 14. September 1982 wurde ich als zweites von drei Kindern in München geboren. Bis zu meinem dritten Lebensjahr, lebte ich mit meiner Mutter Marita Eisenmann-Klein, geboren am 05. September 1947, und meinem Vater Helmfried Ernst Klein, geboren am 10. Mai 1945, sowie meinem Bruder Julian Klein, geboren am 12. Oktober 1978, in München. Mein jüngerer Bruder Konstantin Klein wurde am 9. September 1988 geboren.

Nach unserem Umzug nach Pentling im Landkreis Regensburg im Jahre 1985 besuchte ich die Grundschule Großberg ab 1989. 1993 erfolgte der Übertritt auf das Privat-Gymnasium Pindl in Regensburg, wo ich im Jahre 2002 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

Nach dem Schulabschluss trat ich den Grundwehrdienst als Gebirgssanitätssoldat in Kempten an. Die Entlassung aus dem Wehrdienst erfolgte im Juni 2003.

Im Oktober 2003 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München auf. Dort absolvierte ich nach dem viersemestrigen vorklinischen Studienabschnitt im September 2005 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Nach dem sechssemestrigen klinischen Studienabschnitt wechselte ich für das praktische Jahr an die Universität

Regensburg, wo ich im November 2009 mit dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung das Studium mit Erfolg beendete.

Seit Januar 2010 bin ich als Postdoctoral Fellow in den USA am MD Anderson Cancer Center in Houston, Texas, im Department of Molecular Pathology tätig.

9.3 Erklärung zur Dissertation

ERKLÄRUNG ZUM PROMOTIONSVERFAHREN

nach § 3 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung
der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg

Name: Klein
Vorname: Silvan Maximilian Valentin
geb. am: 14.09.1982
in: München

Ich erkläre,

- dass ich den **Doktorgrad der Medizin / Zahnheilkunde*** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des **medizinischen / zahnmedizinischen Doktorgrades*** zugelassen bin
- dass ich die **medizinische / zahnmedizinische Doktorprüfung*** nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen

- dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe und dass ich die Dissertation nicht bereits an anderer Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe

Houston, Texas 19.05.2010

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Die einmalige Rücknahme des Promotionsgesuches ist bis zur Bestellung der Gutachter zulässig.

* Nicht Zutreffendes bitte streichen